Untersuchungen zum postmortalen Eiweißabbau in Rattengehirnen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wilhelm Theres

Düsseldorf 1981

1982

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

der Universität Düsseldorf

(Direktor: Prof. Dr. H. Schweitzer)

Untersuchungen zum postmortalen Eiweißabbau in Rattengehirnen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wilhelm Theres

Düsseldorf 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf
gez.: Prof. Dr. Arnold

Referent
gez.: Prof. Dr. Schweitzer

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Staib

Inhaltsübersicht
==========

		Seite:
1	Einleitung	1
	1.1 Allgemeines	1
	1.2 Der Proteinabbau	2
	1.2.1 Die Proteolyse	2
	1.2.2 Der Aminosäurenabbau	4
	1.3 Die Problematik einer Todeszeitbestimmung	5
	1.3.1 Die Temperatur	5
	1.3.2 Die mikrobielle Besiedelung	6
	1.3.3 Die Wasserstoffionenkonzentration	6
	1.3.4 Die Sauerstoffzufuhr	6
2	Zielsetzung und Versuchsanordnung	7
	2.1 Allgemeines	7
	2.2 Tierexperimente oder Untersuchungen an menschlichem Obduktionsmaterial ?	7
	2.3 Untersuchungsmaterial	7
	2.4 Einzeltier oder Versuchsserien ?	8
	2.5 Der Versuchsablauf	9
	2.6 Die einzelnen Untersuchungen	9
	2.6.1 Untersuchungen zum Proteolyse- und Abbaugeschehen einzelner Aminosäuren	9
	2.6.2 Untersuchungen über das Vorhandensein der Isopeptide $\overline{\text{Glu Lys}}$ und $\overline{\text{Asp Lys}}$	15
	2.6.3 Beobachtung der pH-Wert Entwicklung	16
	2.6.4 Überprüfung einer Todeszeitformel	17

Seite:

3 Material und Methodik 18

3.1 Versuchsmaterial 18

3.2 Tötungsarten 18

3.3 Fäulnisbedingungen 18

3.4 Entnahme der Gewebeproben 18

3.5 Bestimmung des pH-Wertes der Hirnproben 18

3.6 Aufarbeitung zur Bestimmung der freien Aminosäuren 19

3.7 Aufarbeitung zur Bestimmung des Gesamtgehalts an einzelnen Aminosäuren nach Totalhydrolyse der Proben 2o

3.8 Aufarbeitung zur Untersuchung auf die Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$ 21

3.9 Chromatographische Bestimmung der Aminosäuren und Isopeptide 22

3.1o Auswertung der chromatographischen Analysen 24

3.1o.1 Allgemeines 24

3.1o.2 Korrektur durch den internen Standard 25

3.1o.3 Errechnung der proteingebundenen Aminosäuren 25

4 Ergebnisse und Erläuterungen 26

4.1 Allgemeine , vergleichende Ergebnisse 26

4.1.1 Beeinflussung der verschiedenen Aminosäuren durch das Hydrolyseverfahren 26

Seite:

4.1.2 Vergleich der Proteolyse- und Abbauraten 27

4.2 Ergebnisse zu den einzelnen Aminosäuren 31

4.2.1 Zur Darstellung der Einzelergebnisse 31

4.2.2 1. Gruppe: Glutaminsäure, Glycin, Lysin, Arginin, Isoleucin, Tyrosin, Leucin, Alanin, Histidin, Valin, Phenylalanin 32

4.2.2.1 Die freien Aminosäuren 44

4.2.2.2 Die gebundenen Aminosäuren 45

4.2.3 2. Gruppe: Asparaginsäure, Serin, Threonin 46

4.2.4 Ergebnisse der Untersuchungen auf die Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$ 5o

4.2.5 Die pH-Wert Entwicklung 52

5 Diskussion 55

5.1 Reproduzierbarkeit und Verwendbarkeit für eine Todeszeitbestimmung 55

5.1.1 Die freien Aminosäuren 55

5.1.2 Die proteingebundenen Aminosäuren 56

5.2 Vergleich mit Untersuchungsergebnissen an menschlichen Gehirnen 58

5.3 Wertung der Ergebnisse im Hinblick auf die von DALDRUP entwickelte Todeszeitformel 59

5.4 Wertung der Ergebnisse der pH-Wert Bestimmung 61

6 Zusammenfassung 62

7 Literatur 65

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535716_0064

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die Erforschung des postmortalen Eiweißabbaues gehört seit langem zu den interessanten Aufgaben verschiedener Fachrichtungen. In der Rechtsmedizin bietet dieses biochemische Geschehen einen Ansatzpunkt, dem Problem der Leichenalter- Bestimmung näher zu kommen.

Bereits 1924 bemerkte STRASSMANN : "An der Masse der gebildeten Aminosäuren und der sonstigen Eiweißspaltprodukte kann der Grad der Autolyse bemessen werden." Entsprechend den technischen Möglichkeiten standen zunächst Beobachtungen relativ grober Parameter, wie der Anstieg der Reststickstoffkonzentration, im Vordergrund (WUHRMANN, 1924). Mit der Einführung der Papierchromatographie rückten zunehmend die eigentlichen Aminosäurenbestimmungen in den Mittelpunkt der Forschungsarbeit (WATANABE, 1955, zitiert nach BLEIFUSS). Die heutigen Methoden erlauben die genaue quantitative Erfassung dieser Eiweißbausteine und somit differenziertere Aussagen über das Abbaugeschehen der Proteine.

Diese Abbauvorgänge bieten sich aus mehreren Gründen für eine Leichenalter-Bestimmung an. Versuche von KONIKOVA et al. zeigten, daß die Fähigkeit des Körpers zur Proteinsynthese sehr schnell nach dem Tode erlischt. Man kann also davon ausgehen, daß der postmortale Proteinbestand nur abnehmen kann. Ergebnisse, die von einer Zunahme von Eiweißfraktionen in Liquor oder Blut berichteten, konnten u.a. durch Eindickung infolge

von Wasserverlusten (HABECK et al.) oder Freisetzung aus Erythrozyten erklärt werden (HEIFER u. BOLKENIUS). Außerdem handelt es sich bei diesen katabolen Vorgängen um ein biochemisches Geschehen, das unter Umständen sehr langsam abläuft. Eiweiße wurden z.B. noch in Knochen aufgefunden, die bis zu 2ooo Jahren alt waren (HARSANYI, SANTORA, zitiert nach SPRUNG).

Trotz einer relativ deutlichen zeitlichen Korrelation dieser Vorgänge konnte man bis heute in der Frage der Leichenzeit- Bestimmung nicht zu einem befriedigenden Ergebnis kommen. Mitentscheidend dafür sind die mannigfaltigen Einflüsse auf das Abbaugeschehen, wie z.B. mikrobielle Besiedelung und Lagerungstemperatur, die im Einzelfall nur sehr selten zu rekonstruieren sind.

1.2 Der Proteinabbau

Wie bereits erwähnt, kommt es nach dem Tode sehr rasch zu einem Sistieren der Proteinsynthese, was sich durch den Energiebedarf dieser Prozesse erklären läßt. Stattdessen erfolgt durch Einwirkung eigener und fremder (bakterieller) Enzyme ein stetiger Abbau der Proteinfraktionen. Man kann hier zwei Vorgänge unterscheiden, die sich zeitlich überlappen :

1.) Abbau der Proteine in größere Bruchstücke und schließlich in Aminosäuren (Proteolyse)
2.) Abbau der Aminosäuren

1.2.1 Die Proteolyse

Die Proteolyse wird durch Proteasen und Peptidasen katalysiert,

also Enzymen, die physiologischerweise im Körper vorhanden sind und die nach Untersuchungen von KLEINSORGE nicht von den körpereigenen Energiesystemen abhängen. Diese ersten Schritte des Abbaus durch körpereigene Enzyme wurden deshalb unter dem Begriff Autolyse zusammengefaßt.

Inzwischen haben Forschungen ergeben, daß bereits in dieser ersten Phase mikrobielle Einflüsse eine Rolle spielen, wobei es über Zeitpunkt und Art dieses Einflusses noch unterschiedliche Meinungen gibt. Einerseits gibt es Hinweise darauf, daß Bakterien nicht fähig sind, genuines Eiweiß anzugreifen. Die Beschleunigung des Abbaus bei Anwesenheit von Bakterien kann auf einer Aktivierung körpereigener Enzyme durch Endabbauprodukte der Aminosäuren beruhen (LERKE et al.). Andererseits lassen neuere Untersuchungen vermuten, daß zumindest manche Bakterienstämme fähig sind, mit ihren Enzymen aktiv und frühzeitig in die Proteolyse einzugreifen (SPRUNG). So wurde z.B. nachgewiesen, daß Pseudomonas aeruginosa die Fähigkeit besitzt, verschiedene Plasmaproteine zu spalten (MÜLLER).

KLEINSORGE untersuchte den Proteinabbau am Beispiel des Glaskörper des Auges, dessen Milieu im Gegensatz zu anderen Organen (BONTE, RUSTEMEYER) postmortal über längere Zeit quasi keimfrei bleibt. Er fand bereits nach 2 - 3 Tagen ein Sistieren der Aminosäuren-Produktion,was ebenfalls auf ein frühzeitiges Einsetzen der bakteriellen Proteolyse schließen läßt.

1.2.2 Der Aminosäurenabbau

Im zweiten Schritt des Eiweißkatabolismus werden die freigewordenen Aminosäuren weiter abgebaut, wobei die Decarboxylierung und die Desaminierung als wichtigste Reaktionen zu nennen sind.

Da nach dem Zusammenbruch der Atemkette die energieverbrauchenden endogenen Prozesse nicht weiter ablaufen können, sind für diesen Schritt vorwiegend bakterielle Decarboxylasen und Desaminasen verantwortlich zu machen, was z.B. SCHMIDT et al. anhand von Untersuchungen zum postmortalen Zerfall von Rinderleber beschrieben.

Besonders die Decarboxylierungsprodukte, die sogenannten Ptomaine, waren bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (BERG, BLEIFUSS). Der Zeitpunkt für das Auftreten dieser Fäulnissubstrate, die den Übergang von der autolytischen zur bakteriellen Fäulnisphase kennzeichnen,ist abhängig von äusseren Bedingungen wie Temperatur, pH Wert und mikrobielle Flora. Einen Beweis für die Verantwortung bakterieller Fermente für die Decarboxylierungsprozesse lieferten Versuche von BLEIFUSS. Er fand, daß nach Zusatz eines Antibiotikums zu faulender menschlicher Leber die Fäulnisaminbildung vollständig ausblieb.

Die beiden gegenläufigen Tendenzen, d.h. proteolytische Freisetzung der Aminosäuren einerseits und Weiterabbau andererseits, führen zu einem typischen zweiphasigen Konzentrationsverlauf der freien Aminosäuren (SHIKATA et al. ; BONTE, RUSTEMEYER). Die erste Phase ist gekennzeichnet von

einer Zunahme der freien Aminosäuren mit einem Maximum nach ca 5 - 1o Tagen. Danach führt das verstärkte Bakterienwachstum und der damit verbundene Weiterabbau zu einem Abfall der Konzentrationen bei gleichzeitiger Vermehrung der Abbauprodukte. Vermutlich durch die bakteriell bedingte Proteolyse folgt dann der von den Autoren beobachtete erneute Anstieg der Aminosäurenkonzentrationen mit einem Gipfel nach ca 4 - 5 Wochen.

1.3 Die Problematik einer Todeszeitbestimmung

Die Schwierigkeiten, ein Verfahren zur Todeszeitbestimmung basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen zu entwickeln, liegen in den vielfältigen Parametern, die auf das chemische Abbaugeschehen Einfluß haben. Von diesen sollen hier nur die wichtigsten kurz erläutert werden.

1.3.1 Die Temperatur

Der wichtigste Einflußparameter für das Abbaugeschehen ist die Temperatur. So beobachteten z.B. BONTE und RUSTEMEYER bei einer Temperaturerhöhung von 15° C auf 25° C eine Steigerung des Aminosäurenumsatzes um das zwei- bis dreifache, THEUSNER errechnete für den Metaboliten Delta-Aminovaleriansäure einen Q 1o Wert von 2,5 bis 3,5. Diese meist schwer zu rekonstruierenden Temperaturverhältnisse schränken eine direkte Anwendung des Proteinkatabolismus zur Leichenzeitbestimmung stark ein.

1.3.2 Die mikrobielle Besiedelung

Art und Schnelligkeit von Proteolyse und Abbau sind von der jeweiligen Leichenflora und der damit verbundenen spezifischen Enzymausstattung abhängig. Dies konnte z.B. BLEIFUSS an dem verschiedenartigen Auftreten von Ptomainen nach gezielter Keimbesiedelung zeigen. Wenn man allerdings einmal von Fällen wie z.B. Antibiotikaeinnahmen vor dem Tode absieht, so scheint sich gewöhnlich eine Mischflora zu bilden, die für etwa gleichartige katabole Veränderungen sorgt (BLEIFUSS).

1.3.3 Die Wasserstoffionenkonzentration

Sowohl die Geschwindigkeit des Bakterienwachstums als auch die Aktivität bakterieller Fermente sind von dem jeweils herrschenden pH - Wert abhängig. So bevorzugen bakterielle Decarboxylasen z.B. saures Milieu, wenn sie auch im Alkalischen nicht vollständig inhibiert zu sein scheinen (STARKA). Da die postmortalen pH - Veränderungen in einem relativ weiten Rahmen differieren, sind auch dadurch schwer zu kalkulierende Einflüsse denkbar.

1.3.4 Die Sauerstoffzufuhr

Der Einfluß von aerobem oder anaerobem Milieu auf das Metabolisierungsgeschehen war lange umstritten. Neuere Untersuchungen sprechen dafür, daß sich Sauerstoffatmosphäre hindernd, Stickstoffatmosphäre dagegen fördernd auf Decarboxylierungsvorgänge auswirkt (SCHMIDT et al., BLEIFUSS).

2. Zielsetzungen dieser Arbeit und Versuchsanordnung

2.1 Allgemeines

Die allgemeinen Zielsetzungen dieser Arbeit sind Untersuchungen zum postmortalen Eiweißabbau, weil eventuelle Gesetzmäßigkeiten eine Todeszeitbestimmung ermöglichen könnten. Im folgenden sollen die Überlegungen näher erläutert werden, die schließlich zu der hier verwendeten, speziellen Versuchsanordnung führten.

2.2 Tierexperimente oder Untersuchungen an menschlichem Obduktionsmaterial ?

Zunächst stellte sich die Frage, ob für derartige Untersuchungen tierexperimentelle Verfahren oder Untersuchungen an menschlichem Obduktionsmaterial besser geeignet seien. Letzteres hat den Vorzug einer größeren Relevanz, Tierversuche aber bieten zwei Vorteile, die schließlich ausschlaggebend waren :

1.) Bei menschlichem Obduktionsmaterial sind Todeszeitpunkt und Fäulnisbedingungen oft nur unzureichend zu rekonstruieren, während sie bei Tierversuchen festlegbar sind.

2.) Tieruntersuchungen sind unter gleichen Bedingungen beliebig wiederholbar.

2.3 Das Untersuchungsmaterial

Als spezielles Material wählten wir das Hirngewebe, zum einen weil es durch seine anatomische Lage auch bei fortgeschritte-

ner Fäulnis gegen Kontamination und Vermischung mit anderen Organen gut geschützt ist. Zum anderen zeigten die ersten Versuche von DALDRUP an menschlichem Hirngewebe, daß der postmortale Eiweißzerfall in diesem Organ zur Berechnung der Todeszeit herangezogen werden kann.

2.4 Einzeltier oder Versuchsserien ?

Will man die Konzentrationsänderungen bestimmter Substanzen in Abhängigkeit von der Fäulniszeit untersuchen, so bietet sich als nächstliegende Möglichkeit folgende an : man entnimmt aus einem getöteten Tier in gewissen Zeitabständen Proben des Hirngewebes und analysiert sie. Diese Methode beinhaltet aber die Gefahr, daß durch die Entnahme des Materials die Versuchsbedingungen beeinflußt werden, z.B. durch Kontamination des verbleibenden, weiterfaulenden Gewebes mit zusätzlichen Bakterien.
Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, daß durch das Eindringen von Luft die sich eventuell entwickelnde anaerobe Flora abstirbt.

Deshalb führten wir die Versuche an Serien von gleichzeitig getöteten Versuchstieren durch, von denen in eintägigem Abstand jeweils eines untersucht wurde. So konnten die Organe bis zum Zeitpunkt der Analyse jeweils in der unbeschädigten Schädelkapsel verbleiben und die natürlichen Fäulnisbedingungen blieben weitestgehend erhalten.

2.5 Der Versuchsablauf

Die Versuche wurden in 3 Serien durchgeführt :

1. Serie : 11 männliche und 11 weibliche Ratten, maximale Faulzeit: 1o Tage; Tötung durch Nackenschlag

2. u. 3. Serie : jeweils 9 männliche Ratten, maximale Faulzeit: 1o Tage. Diese Tiere wurden durch eine Überdosis Äther getötet; damit sollte der Einfluß der Tötungsart auf die pH-Entwicklung untersucht werden und eine Acidose des Hirngewebes bewirkt werden (siehe auch 2.6.3).

Die Tiere einer Serie wurden jeweils gleichzeitig getötet und dann bei Zimmertemperatur (ca 2o°C - 25°C) in einer Kiste mit Luftzufuhr der Fäulnis überlassen. In Abständen von ca 24 Stunden wurde jeweils eine Ratte entnommen, das Gehirn herauspräpariert und untersucht.

2.6 Die einzelnen Untersuchungen

2.6.1 Untersuchungen zum Proteolyse- und Abbaugeschehen einzelner Aminosäuren

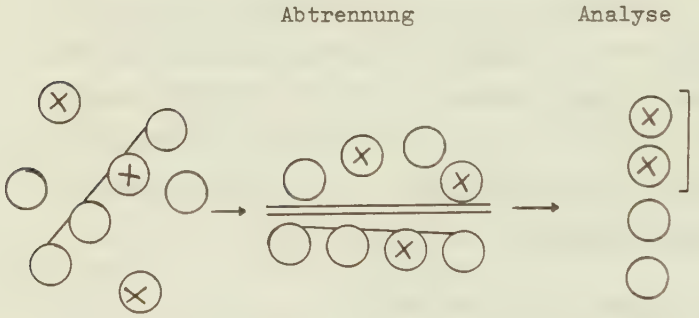
In der Einleitung wurden die wichtigsten Schritte des Eiweißabbaus bereits erwähnt : die Proteolyse, also das Aufspalten der Eiweiße in ihre Bausteine, die Aminosäuren, und der Abbau dieser freigewordenen Aminosäuren.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war es, diese beiden Schritte für bestimmte Aminosäuren parallel zu untersuchen. Entsprechende Fragen sind z.B. : Wie schnell werden die einzelnen Proteinkomponenten aus der Eiweißbindung freigesetzt?

Wie schnell werden die freien Aminosäuren abgebaut ? Inwieweit sind diese Vorgänge reproduzierbar ? Um diesen Fragestellungen nachzugehen, bieten sich vor allem zwei Analysenmethoden an (siehe auch 3.6 und 3.7):

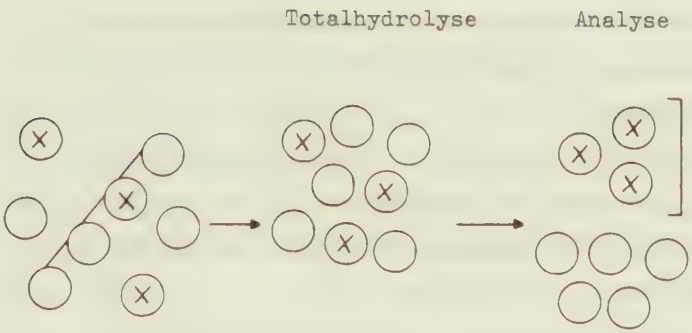
1.) Bestimmung einzelner freier Aminosäuren.

Bei dieser Methode werden nach Abtrennung der Eiweiße die freien Aminosäuren quantitativ bestimmt (im Schema die Aminosäure X)



2.) Bestimmung des Gesamtgehalts bestimmter Aminosäuren.

Hierbei werden sowohl der freie als auch der proteingebundene Anteil einer Aminosäure bestimmt. Dazu werden zunächst alle Peptidbindungen durch eine Totalhydrolyse gespalten und dann die Aminosäure quantitativ nachgewiesen (im Schema die Aminosäure X)



Zur Beurteilung des Proteolyse- und Abbauverhaltens bestimmter Aminosäuren liefert jedes dieser beiden Verfahren für sich allein nur relativ unsichere Ergebnisse. Erst die aufwendigere parallele Anwendung beider Bestimmungsmethoden erlaubt wesentlich genauere Aussagen. Dies soll an zwei fiktiven Beispielen erläutert werden :

Beispiel I

Abb. Nr 1 möge das Konzentrationsverhalten einer freien Aminosäure X über eine gewisse Zeit darstellen.

Abb. Nr. 1: Konzentrationsverhalten einer freien Aminosäure X

Diese Darstellung läßt noch verschiedene theoretische Interpretationsmöglichkeiten für Proteolyse und Abbau dieser Aminosäure zu, z.B. :

1.) Die Aminosäure wird proteolytisch freigesetzt und häuft sich demzufolge in ihrer freien Form an. Zum Zeitpunkt a stoppt die Proteolyse und die bis dahin gebildeten freien Aminosäuren werden abgebaut.

2.) Die Aminosäure wird über den gesamten Zeitraum proteolytisch freigesetzt. Ab dem Zeitpunkt a überwiegen die Abbaureaktionen, sodaß schließlich die freie Aminosäure nicht mehr auftaucht, weil sie sofort nach dem Freiwerden aus dem Eiweißverband durch die Abbaureaktionen "weggefangen" wird.

Welche Interpretation im konkreten Fall zutrifft, läßt sich erst durch eine parallele Bestimmung des Gesamtgehalts klären. Abb. Nr. 2 möge die zeitliche Veränderung des Gesamtgehalts der Aminosäure X im Gehirn wiedergeben.

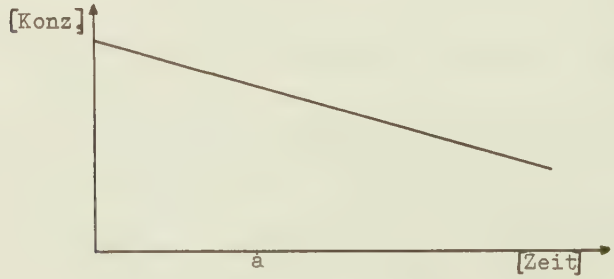


Abb. Nr. 2: Veränderungen des Gesamtgehalts der Aminosäure X

Durch diese Zusatzinformation läßt sich die oben angegebene 2. Interpretationsmöglichkeit belegen. Die stetige Abnahme des Gesamtgehalts an X kann nur durch eine fortlaufende Proteolyse und folgenden Abbau der freien Aminosäure erklärt werden. Das "Verschwinden" der freien Aminosäure muß auf einem Überwiegen der Abbaureaktionen beruhen (siehe z.B. 4.2.3).

Beispiel II

Die folgende Abbildung möge die Konzentrationsänderungen des Gesamtgehalts der Aminosäure Y im Gehirn wiedergeben.

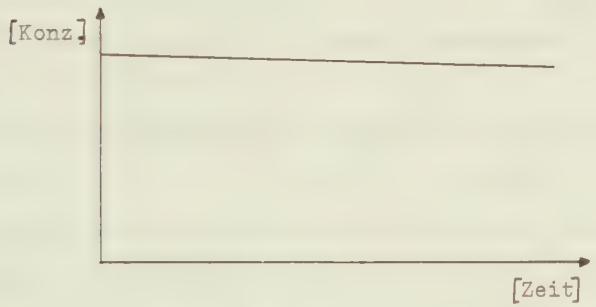


Abb. Nr. 3 : Veränderungen des Gesamtgehalts der Aminosäure Y

Auch diese Darstellung läßt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu, z.B. :

1.) Die Proteolyse der Substanz Y erfolgt über den gesamten Versuchszeitraum nur langsam.

2.) Die proteolytisch freigesetzte Aminosäure Y wird nur

langsam abgebaut, sodaß der Gesamtgehalt der Probe kaum abnimmt.

In diesem Fall läßt sich die Fragestellung durch eine parallele Bestimmung der Aminosäure Y in ihrer freien Form klären. Abb. Nr. 4 möge deren Konzentrationsverhalten wiedergeben.

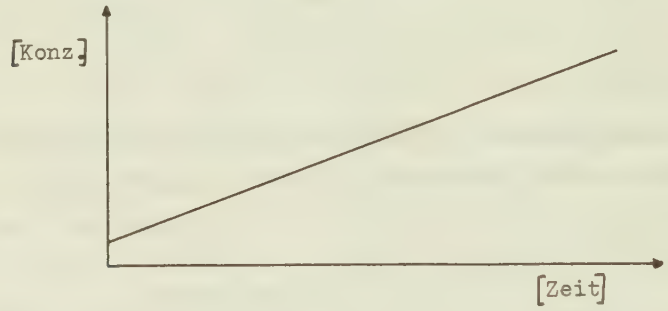


Abb. Nr. 4 : Konzentrationsverhalten der freien Aminosäure Y

Auch hier belegt die Paralleluntersuchung die Richtigkeit der 2. Hypothese. Der Konzentrationsanstieg der freien Aminosäure zeigt, daß diese offenbar kaum abgebaut wird und dies erklärt die nur geringe Abnahme des Gesamtgehalts an Y.

Für die geplanten Untersuchungen war also diese relativ aufwendige Parallelbestimmung notwendige Voraussetzung.

Aus den beiden Angaben, Gesamtgehalt und freier Anteil, läßt sich rechnerisch leicht der proteingebundene Anteil bestimmen : Gesamtgehalt - freier Anteil = proteingebundener Anteil. An der Abnahme dieses proteingebundenen Anteils

läßt sich die Proteolyse der einzelnen Aminosäuren gut verfolgen.

2.6.2 Untersuchungen über das Vorhandensein der Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$.

Den Isopeptidbindungen in Proteinen kommt derzeit ein besonderes Interesse zu. Sie entstehen durch Amidbindungen zwischen der ε-Aminogruppe des Lysin und der ω-Carboxylgruppe von Asparagin- bzw. Glutaminsäuren und erfüllen offenbar eine ähnlich vernetzende Funktion in Proteinen wie die Schwefelbrücken. Einen anschaulichen Hinweis auf die Bedeutung dieser Peptidbrücken lieferten die Untersuchungen der Eihüllen von Regenbogenforellen in verschiedenen Entwicklungsstadien (HAGENMEYER, SCHMITZ, FÖHLES). Es zeigte sich, daß diese Hüllen nach der Befruchtung der Eier wesentlich an Festigkeit gewinnen, die sie aber kurz vor dem Schlüpfen der Fischbrut wieder verlieren. Entsprechende Überprüfungen der Eihüllen erbrachten, daß die enzymatisch gesteuerte Isopeptidbrückenbildung bzw. -auflösung hierfür verantwortlich ist.

Isopeptide wurden auch in verschiedenen anderen Substraten, wie Stratum corneum (ABERNETHY et al.), geronnenem Blut (FOLK u. FINLAYSON), sowie in Milcheiweißen (SCHMITZ et al.) nachgewiesen.

Diese Isopeptide lassen sich durch eine programmierte enzymatische Spaltung der Eiweiße isolieren.(siehe auch 3.8). Dabei werden durch eine Reihe von enzymatischen

Reaktionen alle Peptidbindungen, bis auf die Isopeptidbindungen, gespalten. Die so isolierten Isopeptide können dann neben den freien Aminosäuren chromatographisch nachgewiesen werden.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob diese Isopeptide unter Umständen eine Rolle bei der rasch nachlassenden Festigkeit von Gehirngewebe spielen.

2.6.3 Beobachtung der pH-Wert Entwicklung

Zwei wesentliche Gründe haben uns veranlaßt, die pH-Wert Entwicklung während der Versuchsserien genau zu verfolgen.

1.) Der jeweilige pH-Wert hat einen nicht zu vernachlässigenden Einfluß auf den Eiweißkatabolismus (siehe auch 1.3.3). Es ist also wichtig diesen Parameter zu verfolgen, um eventuelle Korrelationen zwischen pH-Wert des Gewebes und Proteolyse der Eiweiße bzw. Abbau der Aminosäuren feststellen zu können.

2.) In der 2. und 3. Versuchsserie wurde eine andere Tötungsart der Versuchstiere gewählt (siehe auch 2.5). Durch die Tötung mittels einer Überdosis Äther sollte, bedingt durch eine terminale Asphyxie der Tiere, eine agonale pH-Wert Erniedrigung des Hirngewebes erreicht werden. WANG und SONNENSCHEIN haben einen solchen pH- Wert Abfall des Hirngewebes bei Katzen unter akuter Asphyxie beschrieben.

Durch diese Versuchsänderung sollte eine bessere Vergleichbarkeit zu den Untersuchungen von DALDRUP an menschlichem Hirngewebe erreicht werden. Er fand, ebenso wie DIESSNER

und LAHL in der frühen postmortalen Phase stets saure pH-Werte vor.

2.6.4 Überprüfung einer Todeszeitformel.

DALDRUP entwickelte bei Untersuchungen zum postmortalen Eiweiß- und Aminosäurenzerfall eine Todeszeitformel, die im Wesentlichen auf dem Quotienten

$$\frac{[\text{Gamma-Aminobuttersäure}]+[\text{Alpha-Aminobuttersäure}]}{[\text{Glutaminsäure}]}$$ beruht.

Grundlegende Idee war dabei die Hypothese, daß sämtliche in der Formel zu berücksichtigenden Reaktionen, nämlich das Freisetzen der Glutaminsäure aus der Proteinbindung einerseits und deren Weiterabbau andererseits, etwa gleichermaßen von Einflüssen wie Temperatur, mikrobieller Flora etc. abhängen. Unter dieser Voraussetzung werden bei einer Änderung dieser Einflüsse jeweils alle Reaktionen gleichermaßen betroffen, sodaß der in der Formel enthaltene Quotient unabhängig von den Einflüssen und charakteristisch für eine bestimmte Todeszeit wird.

Der Autor weist bereits auf bestimmte Bedingungen hin. So sollte der pH-Wert des Untersuchungsgutes zwischen 4,5 und 6,8 liegen, um eine ausreichende Decarboxylasenaktivität zu garantieren.

Anhand unserer Ergebnisse soll diese Formel überprüft werden.

3. Material und Methodik

3.1 Versuchsmaterial

Die Untersuchungen wurden an Rattengehirnen vorgenommen. Insgesamt wurden 4o Versuchstiere untersucht :

1. Serie : 11 männliche und 11 weibliche Ratten
2. und 3. Serie : jeweils 9 männliche Ratten

3.2 Tötungsarten

Die Versuchstiere der 1. Serie wurden mechanisch, d.h. durch Nackenschlag, getötet. Die Tiere der 2. und 3. Serie wurden durch eine Überdosis Äther getötet.

3.3 Fäulnisbedingungen

Nach der Tötung wurden die Tiere in einer Kiste mit Luftzufuhr bei Zimmertemperatur (ca 2o° C - 25° C) der Fäulnis überlassen. Die maximale Faulzeit betrug in allen Serien 1o Tage.

3.4 Entnahme der Gewebeproben

Für die Untersuchungen wurde in ca 24 stündigem Abstand jeweils eine Ratte entnommen, die Schädelkalotte eröffnet und die gesamte Hirnmasse herausgelöst. Die erste Ratte einer Serie wurde ca 3o Minuten nach der Tötung untersucht.

3.5 Bestimmung des pH-Wert der Hirnproben

Zur pH Messung wurde eine Probenmenge des homogenisierten Hirnmaterials im Bereich von ca 2oo mg - 4oo mg mit der

zehnfachen Menge an destilliertem Wasser aufgefüllt und durchgemischt (siehe auch 3.6). Für die Messung wurde ein Digital-pH-Meter (Metrohm E 532) mit zugehöriger kombinierter Glas-pH-Elektrode verwendet.

3.6 Aufarbeitung zur Bestimmung der freien Aminosäuren

Zur Bestimmung der freien Aminosäuren wurde in leicht modifizierter Form das von T.DALDRUP entwickelte Verfahren gewählt.

Die Gewebeproben wurden zunächst mechanisch homogenisiert, eine genau abgewogene Probenmenge im Bereich von ca 2oo mg - 4oo mg mit der zehnfachen Menge an destilliertem Wasser aufgefüllt und dann der pH-Messung zugeführt (siehe auch 3.5)

Anschließend wurde Norleucin als interner Standard zugegeben und die Probe mit 15 % iger wässriger Sulfosalicylsäure in einer Menge, die 1/4 der angegebenen Wassermenge entspricht, enteiweißt.

Die ausgefallenen Eiweiße wurden durch Zentrifugieren und Filtrieren vom Überstand abgetrennt. Der Rückstand wurde in 4 ml o,1 n HCl aufgenommen und erneut zentrifugiert und filtriert.

Die vereinigten Filtrate wurden mit einer solchen Menge an Verdünnungspuffer, pH 2,2 , versetzt, daß 1 ml der Lösung einer Organeinwaage von 25 mg entsprach.

Die so aufgearbeiteten Proben wurden der chromatographischen Analyse zugeführt (siehe 3.9)

3.7 Aufarbeitung zur Bestimmung des Gesamtgehalts an einzelnen Aminosäuren nach Totalhydrolyse der Proben.

Für diese Bestimmung wurde das von I. SCHMITZ beschriebene Totalhydrolyseverfahren in leicht modifizierter Form angewendet. Von dieser Autorin ist das Verfahren für eine Eiweißmenge von 1o mg beschrieben. Um einen sicheren Überschuß an hydrolysierender HCl zu gewährleisten, verwendeten wir eine Probenmenge von ca 4o mg, wobei wir einen Eiweißanteil des Hirngewebes von ca 1o % zugrunde legten (DE VUYST et al.).

Eine genau abgewogene Probenmenge im Bereich von 35 mg - 45 mg des homogenisierten Materials wurde zunächst in ein Bombenrohr eingebracht. Nach Zugabe von 2 ml 6n HCl und des Norleucinstandards wurde das Bombenrohr unter Vakuum zugeschmolzen und anschließend die Probe bei 1o5°C 24 Stunden hydrolysiert.

Danach wurde durch Zugabe von 2 ml 6n NaOH neutralisiert und mit Puffer pH 2,2 auf 2o ml verdünnt. Die so aufgearbeiteten Proben wurden anschließend der chromatographischen Analyse unterzogen (siehe 3.9).

Es zeigte sich anhand der Standard- Wiederfindungsraten und anhand von Versuchen zu Aminosäurenabbauraten (siehe 4.1.1), daß ein Aufbewahren von tiefgekühlten Proben kaum zu wesentlichem Aminosäureabbau führt, daß aber keinesfalls ein Aufbewahren in 6n HCl - auch nicht in tiefgekühltem Zustand - toleriert wird.

3.8 Aufarbeitung zur Untersuchung auf die Isopeptide Asp Lys und Glu Lys.

Die Untersuchung auf Isopeptide wurde nach enzymatischer Hydrolyse der Proben durchgeführt. Wir verwendeten dabei ein Verfahren, welches I. SCHMITZ zur enzymatischen Hydrolyse von Wollproteinen entwickelte.

Der Abbau erfolgte in thermostatisierten Glasröhrchen unter leichtem Rühren (Minimagnetrührer) bei 39°C.

Eine genau abgewogene Probenmenge des homogenisierten Materials im Bereich von 35 mg - 45 mg wurde dazu in 2 ml stark verdünnter HCl pH 1,9 suspendiert. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum fügt man der Suspension ein Kriställchen Thymol zu.

Parallel dazu wurde jeweils eine zweite Probe mit definierter Menge an den entsprechenden Isopeptiden angesetzt und dem gesamten Hydrolyse- und Analyseverfahren unterzogen. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß die Isopeptide bei der Hydrolyse nicht zerstört werden (siehe 4.2.4)

Die enzymatische Hydrolyse erfolgt in 3 Stufen :

1. Stufe : Nach Zugabe von o,2 mg Pepsin läßt man 24 Stunden abbauen.

2. Stufe : Der pH-Wert der Lösung wird durch Zugabe von o,o37 ml 2m Trispuffer auf pH 8,2 erhöht. Man fügt o,2 mg Pronase E zu und läßt erneut 24 Stunden reagieren.

3. Stufe : Zusatz von o,2 mg Aminopeptidase M und o,o5 ml

einer Suspension von Prolidase in Amoniumsulfatlösung (entsprechend o,5 mg Prolidase). Nach 24 Stunden Reaktionszeit wird der Abbau durch Zugabe von o,8 ml 1m Zitronensäurelösung gestoppt, das Hydrolysat wird mit Puffer pH 2,2 auf 2o ml verdünnt.

Das so aufgearbeitete Material wird anschließend der chromatographischen Analyse zugeführt (siehe 3.9).

3.9 Chromatographische Bestimmung der Aminosäuren und Isopeptide.

Zur Analyse der aufgearbeiteten Proben diente ein Aminosäurenanalysator nach dem Ionenaustauscherprinzip und Anfärbung der Aminosäuren durch Ninhydrin (Beckman : Multichrom B LC 4255).

Der Analysator enthält als Detektor zum einen ein UV-Photometer (ISCO : UA 5 mit optischer Einheit, Typ 6, Wellenlänge 28o nm), zum anderen ein zweites Photometer zur Messung der Ninhydrinfärbung (siehe auch 3.1o). Ein angeschlossener Integrator dient der quantitativen Auswertung der Analysen.

Das von DALDRUP beschriebene Analyseprogramm mußte leicht modifiziert werden, um mit diesem Standardanalysenverfahren auch Isopeptide nachweisen zu können.

In der folgenden Abbildung ist das Flußschema des Analysators wiedergegeben :

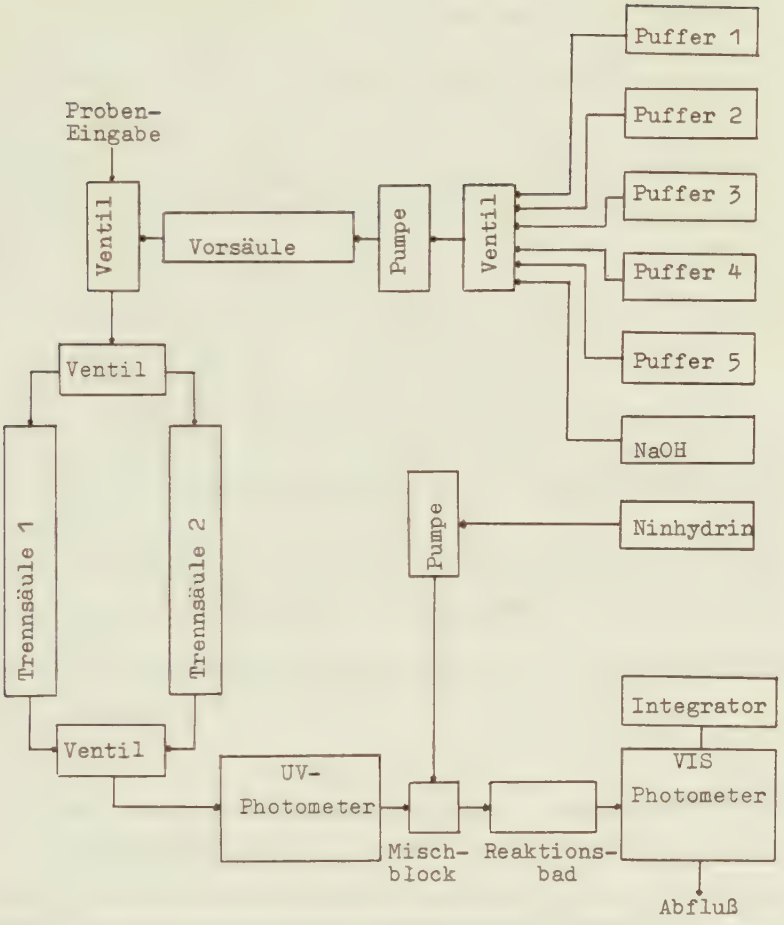


Abb. Nr. 5 : Flußschema des Aminosäurenanalysators

Der Schreiber des Analysators zeichnet die erscheinenden Aminosäuren als Peaks auf. Die folgende Abbildung zeigt beispielhaft das Chromatogramm eines 6 Tg post mortem entnommenen menschlichen Gehirns. Der Oberlauf wurde bei

28o nm vom UV-Detektor registriert.

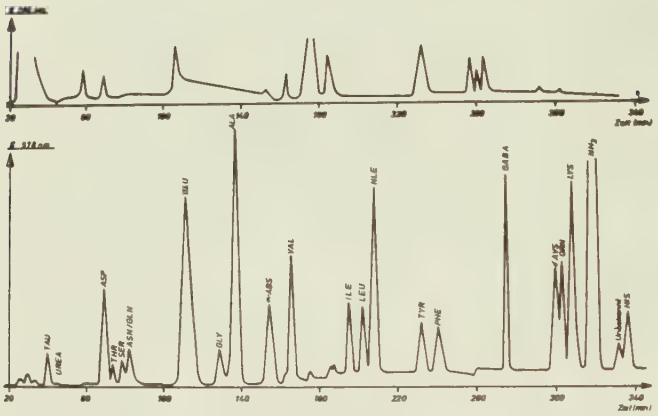


Abb. Nr. 6 : Chromatographische Trennung der freien Aminosäuren eines faulen Gehirns

3.1o Auswertung der chromatographischen Analysen

3.1o.1 Allgemeines

Sowohl für die qualitative als auch für die quantitative Auswertung wurde das von DALDRUP entwickelte Verfahren übernommen. Qualitativ lassen sich die verschiedenen Substanzen anhand ihrer spezifischen Retentionszeiten identifizieren. Für die quantitativen Berechnungen dienten die parallelen Schreiber- und Integratoraufzeichnungen als Grundlage, wobei jedem Schreiberpeak ein Integratorwert zugeordnet werden kann. Die entgültigen Berechnungen erfolgen anhand von Eichkurven für die jeweiligen Substanzen.

3.1o.2 Korrektur durch den internen Standard

Jeder Probe wurde als interner Standard Norleucin in einer definierten Menge zugegeben (siehe 3.6 und 3.7). Bei jeder Analyse wurde die wiedergefundene Menge dieses Standards bestimmt. Durch den Quotienten Istwert/Sollwert erhält man den Korrekturfaktor für die jeweilige Probe. Hierdurch lassen sich Aufarbeitungs- und Analysenfehler, wie z.B. Schwankungen der Ninhydrinfärbung, größtenteils ausgleichen.

3.1o.3 Errechnung der proteingebundenen Aminosäuren

Die freien Aminosäuren lassen sich auf die beschriebene Art direkt bestimmen. Die Werte für die proteingebundenen Aminosäuren wurden nach der Parallelmessung von Gesamtgehalt und freiem Gehalt rechnerisch ermittelt :
Gesamtgehalt für X - freie Aminosäuren X = proteingebundener Anteil der Aminosäure X.

4 Ergebnisse und Erläuterungen

4.1 Allgemeine vergleichende Ergebnisse

Bevor die verschiedenen Aminosäuren im Einzelnen besprochen werden, sollen hier die allgemeinen Ergebnisse der gesamten untersuchten Gruppen wiedergegeben werden.

4.1.1 Beeinflussung der verschiedenen Aminosäuren durch das Hydrolyseverfahren.

In einem Vorversuch überprüften wir, inwieweit Aminosäuren bei der Hydrolyse zerstört werden. Dazu wurden zwei Testlösungen mit definierten Mengen an freien Aminosäuren verwendet, wobei eine der Proben dem normalen Hydrolyseverfahren unterzogen wurde. Danach wurden beide Proben analysiert und die Ergebnisse verglichen.

Asparaginsäure	: + 1,5 %	Methionin	: - 59,3 %
Threonin	: - 10,3 %	Isoleucin	: - 4,6 %
Serin	: - 5,4 %	Norleucin	: - 6,5 %
Glutaminsäure	: - 3,8 %	Tyrosin	: - 12,7 %
Glycin	: - 6,3 %	Phenylalanin	: - 4,6 %
Alanin	: - 3,6 %	Lysin	: - 7,1 %
Cystein	: - 51,6 %	NH_3	: + 37,8 %
Valin	: - 8,4 %	Histidin	: - 6,9 %
Arginin	: - 7,3 %		

Tabelle Nr. 1 : Prozentuale Abweichung der Wiederfindungsraten nach der Hydrolyse

Wie erwartet werden fast alle Aminosäuren durch das Hydrolyseverfahren angegriffen. Einen besonders hohen Abbau erfahren dabei Cystein mit 51,6 % und Methionin mit 59,3 %. Die Werte dieser beiden Aminosäuren blieben deshalb für die weiteren Betrachtungen unberücksichtigt.

Für die übrigen Aminosäuren liegt der Abbau durch das Hydrolyseverfahren um oder unter 1o %. Dieser Verlust wird weitgehend durch den Korrekturfaktor ausgeglichen, da Norleucin als interner Standard in ähnlicher Weise abgebaut wird.

Charakteristischerweise findet sich infolge dieser Abbaureaktionen eine Anhäufung von Ammoniak (NH_3).

4.1.2 Vergleich der Proteolyse- und Abbauraten.

Im folgenden Teil werden die vergleichenden Ergebnisse von Proteolyse- und Abbauraten der einzelnen Aminosäuren wiedergegeben :

1.) Proteolyserate : Dieser Wert besagt, wieviel Prozent der Ausgangsmenge einer Aminosäure nach 1o Tagen aus der Eiweißbindung freigesetzt wurde.

Beispiel :
Proteingebundene Aminosäure X
am Versuchsanfang: 1oo nmol/mg

Proteolyserate: 4o %

Proteingebundene Aminosäure X
am Versuchsende: 6o nmol/mg

2.) Gesamtabbauraten : Dieser Wert bezieht sich auf den Abbau der proteolytisch freigesetzten Aminosäuren und besagt, wieviel Prozent der zu Versuchsanfang vorhandenen Gesamtmenge an einer Aminosäure (proteingebundener + freier Anteil) am Versuchsende abgebaut, d.h. als Aminosäure X nicht mehr vorhanden sind.

Beispiel :

Gesamtmenge der Aminosäure X
am Versuchsanfang : 1oo nmol/mg

Gesamtabbaurate : 25 %

Gesamtmenge der Aminosäure X
am Versuchsende : 75 nmol/mg

Da sich beide Raten auf annähernd die gleiche Ausgangsmenge beziehen, kann die Abbaurate in der Regel nur die Höhe der Proteolyserate erreichen, da die abzubauenden Aminosäuren vorher aus der Eiweißbindung freigesetzt werden.

Die vergleichenden Ergebnisse dieser Werte sind auf den folgenden Seiten den Abbildungen Nr. 7 und Nr. 8 zu entnehmen.

Die Werte der Proteolyseraten liegen zwischen maximal 43 % für Glutaminsäure und minimal 25 % für Valin, d.h. nach 1o Tagen Fäulnis liegen noch - bezogen auf den Anfangswert - 57 % der Glutaminsäure und 75 % des Valin in Eiweiß gebunden vor.

Dies ist auch bei der Todeszeitbestimmung anhand des Eiweißkatabolismus zu bedenken. Das Zeitintervall für eine

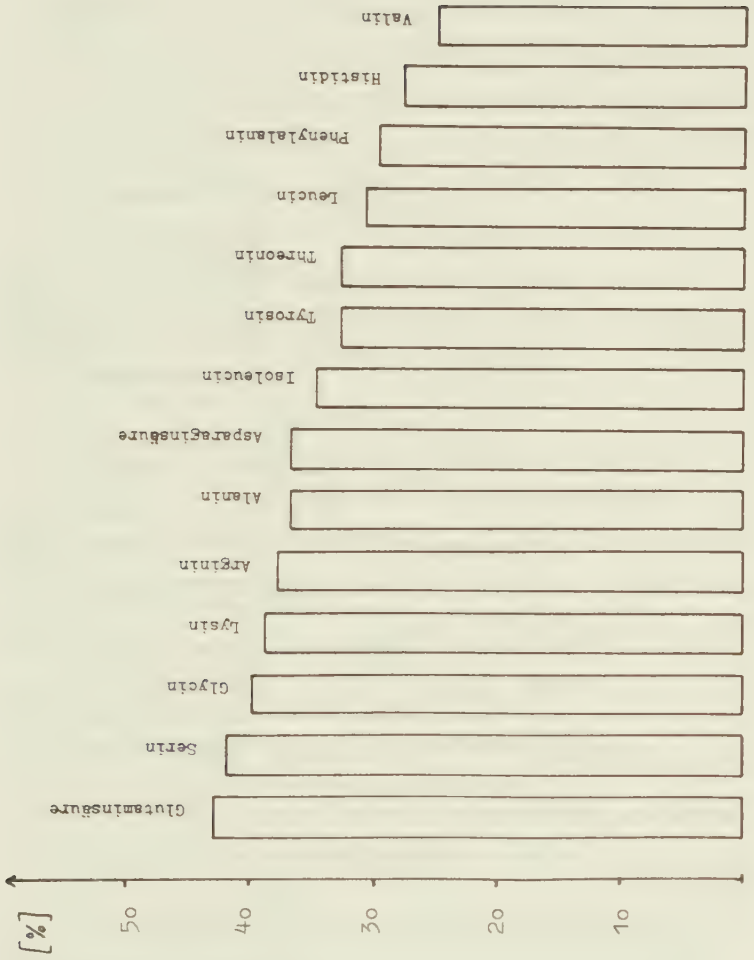


Abb. Nr. 7 : Vergleichende Darstellung der Proteolyseraten

Abb. Nr. 8 : Vergleichende Darstellung der Gesamtabbauraten

derartige Bestimmung wird durch das "Aufbrauchen" der Proteine auf natürliche Weise begrenzt (siehe auch 5.1.2).

Die Gesamtabbauraten liegen zwischen 43 % für Serin und o % für Valin und Alanin. Serin wird also nach seinem Freiwerden aus der Eiweißbindung sehr gut abgebaut (siehe auch 4.2.3). Bei Valin und Alanin hingegen findet offenbar unter den vorliegenden Bedingungen kein Abbau der freigesetzten Aminosäuren statt, sodaß diese am Versuchsende unverändert in ihrer freien Form vorliegen (siehe auch 4.2.2).

Bei den übrigen untersuchten Aminosäuren scheint sich ein gewisses Gleichgewicht zwischen Proteolyse und Abbau einzustellen, was dazu führt, daß sich die jeweilige freie Aminosäure auf ein bestimmtes Niveau einpendelt (siehe auch 4.2.2).

Diese Gegenüberstellung zeigt außerdem, daß es keineswegs möglich ist, aus der Menge an freier Aminosäure auf die entsprechende Proteolyserate zu schließen. Ebenso ist es umgekehrt nicht möglich, aus einer hohen oder niedrigen Proteolyserate auf eine entsprechende Menge an freier Aminosäure zu folgern (siehe auch 2.6.1).

4.2 Ergebnisse zu den einzelnen Aminosäuren

4.2.1 Zur Darstellung der Einzelergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse zu den einzelnen Aminosäuren aufgeführt. In der ersten Versuchsreihe waren die Resultate der Totalhydrolysen nach einem Verfahrensfehler nicht brauchbar, hier sind deshalb keine Angaben zu protein-

gebundenen Aminosäuren möglich.

Um eine größere Übersichtlichkeit zu erreichen, wurden nur die Ergebnisse der zweiten Serie, auf die sich auch die errechneten Proteolyse- und Abbauraten beziehen, in graphischer Form dargestellt. Die Gesamtergebnisse sind in Tabellen wiedergegeben.

Für die graphischen Darstellungen der zweiten Serie blieben die Ergebnisse der proteingebundenen Aminosäuren für den 8. Fäulnistag unberücksichtigt, da hier offensichtlich ein Verfahrensfehler - vermutlich in der Standardzugabe - vorliegt. Hinweise dafür sind einerseits die bei fast allen Aminosäuren ungewöhnlich erhöhten Werte,was für eine geringe Fäulnis sprechen würde, andererseits ein stark erhöhter Ammoniakwert, der für eine fortgeschrittene Fäulnis charakteristisch wäre.

Zeichenerklärung für die tabellarischen Darstellungen :

--- : Der Wert wurde nicht erhoben oder war aus technischen Gründen nicht zu errechnen.

S : Die Aminosäure war in Spuren vorhanden, sodaß ein Peak vorlag, der nicht mehr vom Integrator erfaßt wurde.

O : Die Aminosäure tauchte auch nicht als Peak auf.

4.2.2 1. Gruppe : Glutaminsäure, Glycin, Lysin, Arginin, Alanin, Isoleucin, Tyrosin, Leucin, Phenylalanin, Histidin, Valin.

	Glutaminsäure											
	Ausgangs-wert	1 Tag	2 Tage	4 Tage	6 Tage	8 Tage	10 Tage	12 Tage	14 Tage	16 Tage	18 Tage	20 Tage
freie Aminosäuren	Konzentration µmol/g											
1. Serie ♀	8,61	11,04	12,50	12,04	16,06	15,85	27,04	16,65	36,66	19,90	18,09	
1. Serie ♂	8,74	10,68	11,66	12,93	14,99	15,12	13,91	26,41	14,40	12,66	34,94	
2. Serie	9,25	9,32	11,44	12,50	11,75	---	---	14,13	17,74	22,43	25,95	
3. Serie	7,58	10,83	12,42	12,65	13,12	---	---	16,47	20,67	19,40	18,87	
proteingeb. Aminosäuren												
2. Serie	106,96	95,99	89,89	88,44	84,01	---	---	75,17	68,54	65,41	61,97	
3. Serie	101,11	99,33	85,59	79,97	75,64	---	---	75,75	59,34	56,97	53,39	

Tabelle Nr. 2 : Postmortale Konzentrationen der freien und gebundenen Glutaminsäure im Rattengehirn

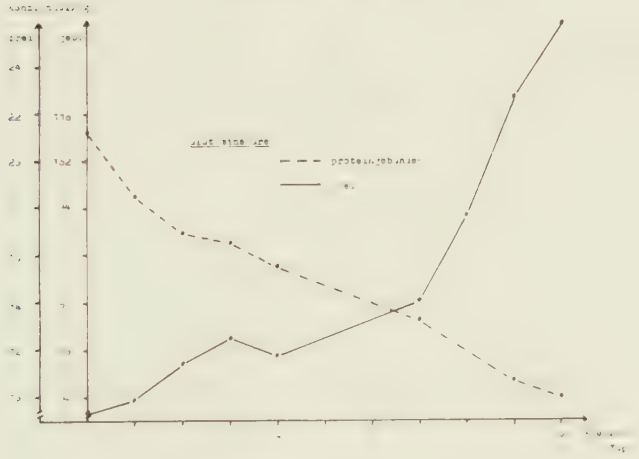


Abb. Nr. 9 : Konzentrationsverhalten der freien und gebundenen Glutaminsäure im Rattengehirn (2. Serie)

Glycin	Konzentration µmol/g									
	Ausgangswert	Haltzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	2,75	5,34	6,74	9,00	11,64	9,38	17,73	11,71	---	15,34	14,54
1. Serie ♂	3,10	5,20	6,34	7,85	11,37	10,95	9,99	3,50	14,02	15,16	26,12
2. Serie	1,52	3,47	4,99	6,38	6,96	---	---	10,69	13,92	16,13	20,38
3. Serie	1,79	4,18	5,99	6,87	7,09	---	---	12,13	13,35	13,25	14,30
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	69,47	62,92	60,23	58,67	54, 9	---	---	46,97	54,49	46,54	42,04
3. Serie	65,59	60,00	57,23	50,33	52,14	---	---	50,30	40,35	37,26	35,17

Tabelle Nr. 3 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Glycin im Rattengehirn

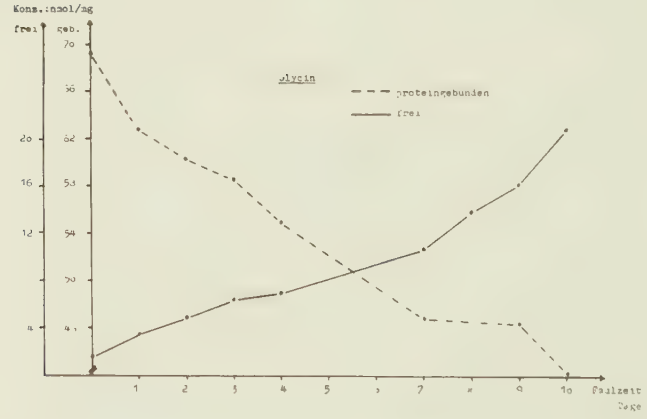


Abb. Nr. 10 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Glycin im Rattengehirn (2. Serie)

Lysin

	Ausgangs-wert	Konzentrationen nmol/mg Feuchtgewicht 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	1,17	3,44	4,56	7,62	7,83	5,63	9,95	11,1o	21,2o*	9,64	1o,2o
1. Serie ♂	1,42	3,33	4,61	4,87	7,79	6,47	6,34	13,1o	9,oo	1o,27	2o,41
2. Serie	o,55	1,75	3,1o	4,28	4,8o	---	---	6,32	9,23	11,31	14,3o
3. Serie	o,68	2,19	3,64	3,74	4,o9	---	---	1,18	7,92	8,45	1o,25
proteingebundene Aminosäuren:											
2. Serie	59,44	54,7o	51,48	51,44	4o,o7	---	---	45,93	47,5o	4o,42	36,65
3. Serie	49,68	47,31	45,o4	44,37	43,27	---	---	45,32	33,35	32,31	28,39

Tabelle Nr. 4 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Lysin im Rattengehirn

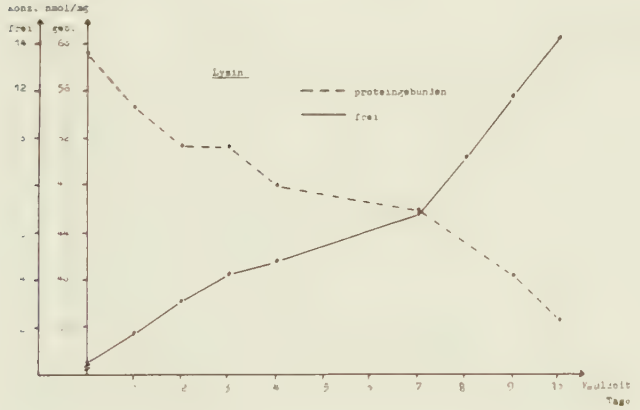


Abb. Nr. 11 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Lysin im Rattengehirn (2. Serie)

	Arginin										
	Konzentration: nmol/ug										
	Ausgangs-wert	Feulzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	0,69	1,47	1,64	2,15	3,92	1,36	1,77	0,55	8	8	1,16
1. Serie ♂	0,69	1,45	1,38	0,78	2,08	1,61	0,59	1,39	0,81	0,69	1,11
2. Serie	0,33	0,90	1,37	1,71	1,55	---	---	3,02	3,63	2,61	3,22
3. Serie	0,42	1,06	1,40	1,36	0,96	---	---	0,91	1,33	8	0,90
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	42,40	39,10	36,96	35,15	34,74	---	---	29,46	34,65	28,92	26,67
3. Serie	38,55	38,42	32,26	29,21	30,62	---	---	27,75	23,52	22,97	22,18

Tabelle Nr. 5 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Arginin im Rattengehirn

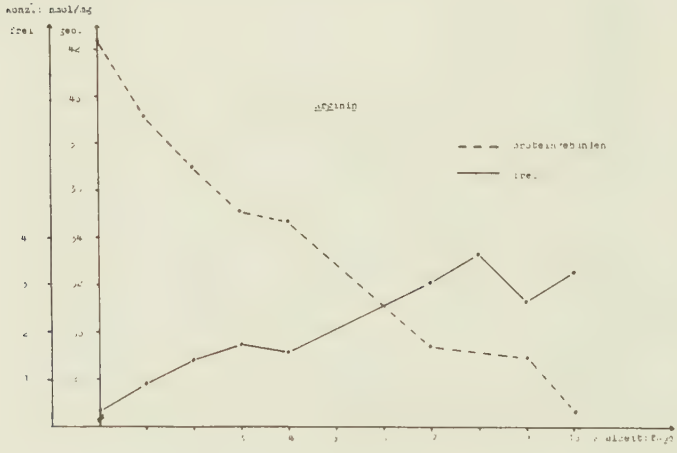


Abb. Nr. 12 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Arginin im Rattengehirn (2. Serie)

	Alanin										
	Konzentration: nmol/g										
	ausgangs-wert	Verlaufszeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	2,16	4,93	6,82	12,13	15,34	12,98	23,18	20,52	42,35	26,00	25,93
1. Serie ♂	2,62	5,39	7,05	8,98	14,86	14,23	14,46	25,44	21,59	22,95	33,90
2. Serie	1,17	2,90	5,03	6,99	7,00	---	---	14,66	19,49	23,14	27,00
3. Serie	1,23	4,10	6,39	8,09	8,94	---	---	17,39	19,17	21,09	21,49
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	70,67	63,93	60,94	59,17	56,97	---	---	52,00	63,10	47,36	44,54
3. Serie	66,24	60,57	58,15	55,79	54,75	---	---	55,56	44,11	43,55	37,32

Tabelle Nr. 6 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Alanin im Rattengehirn

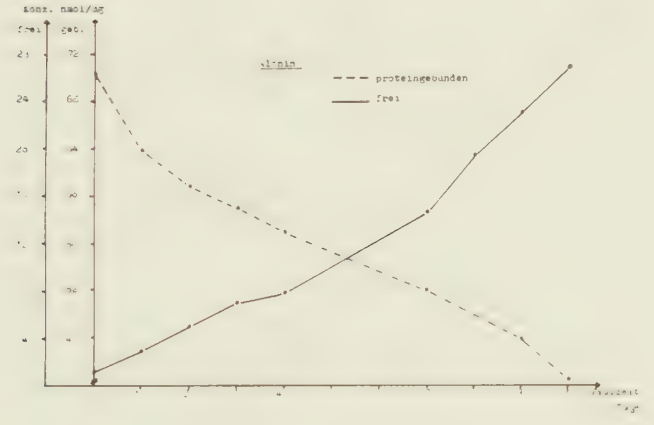


Abb. Nr. 13 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Alanin im Rattengehirn (2. Serie)

Isoleucin	Konzentration µmol/g										
	Ausgangs-wert	Vaultzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	0,36	1,21	1,74	2,67	3,55	2,38	5,09	3,99	5,62	5,23	4,52
1. Serie ♂	0,41	1,29	1,69	2,17	2,93	3,12	3,13	5,25	4,79	4,63	6,91
2. Serie	0,15	0,52	1,14	1,68	1,77	---	---	3,81	4,47	5,24	6,59
3. Serie	0,16	0,80	1,42	1,84	1,92	---	---	4,33	4,33	4,19	3,94
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	31,67	30,07	28,93	28,26	31,70	---	---	25,93	23,07	24,33	20,41
3. Serie	26,30	25,68	26,20	24,10	24,51	---	---	21,12	17,95	16,40	16,70

Tabelle Nr. 7 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Isoleucin im Rattengehirn

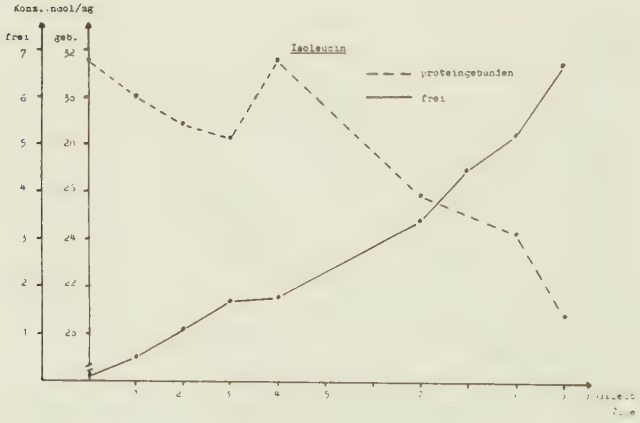


Abb. Nr. 14 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Isoleucin im Rattengehirn (2. Serie)

	Ausgangs-wert	Faulzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
Tyrosin						Konzentration nmol/mg					
freie Aminosäuren											
1. Serie ♀	o,35	o,93	1,25	—	2,04	1,73	1,o2	1,11	2,15	—	o,97
1. Serie ♂	o,4o	o,93	1,29	1,36	2,41	2,24	o,73	4,16	1,16	o,63	8
2. Serie	3	o,5o	o,36	1,23	1,43	—	—	2,47	2,95	3,35	3,31
3. Serie	8	o,62	1,o8	1,25	1,32	—	—	1,21	2,45	1,2o	1,14
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	22,45	2o,39	19,94	19,74	19,oo	—	—	17,32	13,71	16,56	15,25
3. Serie	19,77	19,o9	18,o1	16,94	17,78	—	—	17,37	14,32	13,49	13,23

Tabelle Nr. 8 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Tyrosin im Rattengehirn

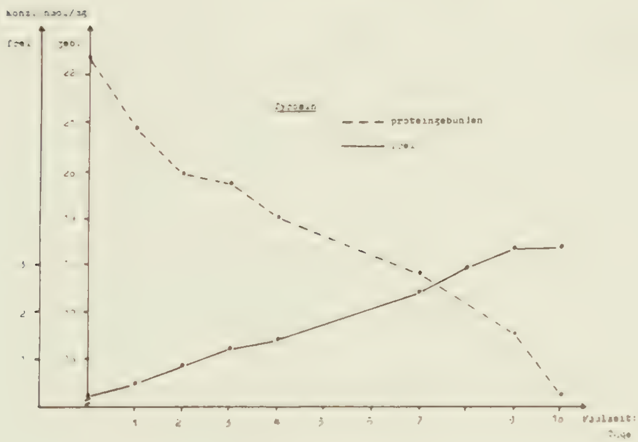


Abb. Nr. 15 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Tyrosin im Rattengehirn (2. Serie)

Leucin	Ausgangs-wert	Reifezeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
	Konzentration nmol/g										
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	0,76	2,64	3,58	4,70	6,88	5,64	11,23	6,90	5,11	9,29	8,19
1. Serie ♂	0,82	2,73	3,72	4,37	6,36	1,50	5,63	10,25	7,85	7,76	15,49
2. Serie	0,27	1,20	2,49	3,57	3,88	---	---	6,97	9,00	10,38	13,03
3. Serie	0,46	1,82	3,25	3,89	4,15	---	---	8,54	8,55	7,88	7,65
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	73,90	67,91	64,37	63,58	62,03	---	---	58,62	63,03	54,04	51,06
3. Serie	64,58	61,94	58,87	57,33	56,07	---	---	56,32	47,51	44,93	42,03

Tabelle Nr. 9 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Leucin im Rattengehirn

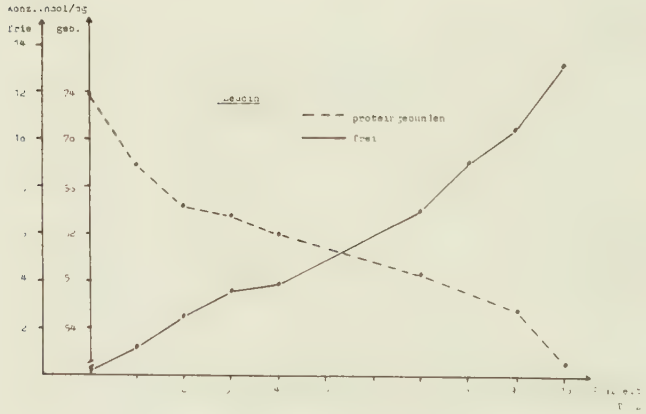


Abb. Nr. : 16 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Leucin im Rattengehirn (2. Serie)

Phenylalanin	Konzentration nmol/g									
	Ausgangswert	Postmortalzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	0,36	1,09	1,48	---	3,45	2,39	4,79	2,79	6,44	2,77	2,93
1. Serie ♂	0,44	1,03	1,54	1,81	3,06	2,85	2,23	5,35	2,94	2,30	4,59
2. Serie	8	0,89	0,95	1,40	1,68	---	---	3,21	4,00	4,15	5,57
3. Serie	0,27	0,70	1,29	1,56	1,73	---	---	3,65	3,57	2,83	3,00
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	32,45	29,85	28,68	27,90	27,14	---	---	25,36	28,72	25,32	22,81
3. Serie	28,44	28,09	25,87	25,09	26,24	---	---	25,56	21,59	20,53	19,54

Tabelle Nr. 1o : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Phenylalanin im Rattengehirn

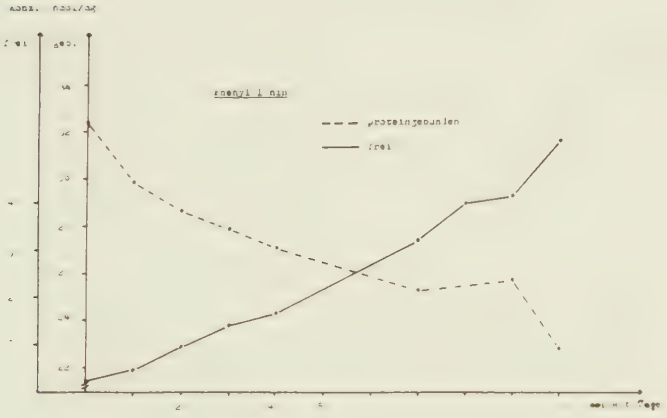


Abb. Nr. 17 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Phenylalanin im Rattengehirn (2. Serie)

Histidin

Konzentration: nmol/ag

	Ausgangs-wert	Faulzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	0,38	0,89	1,32	2,09	0,93	0,68	1,20	---	3,95	---	0,69
1. Serie ♂	0,35	0,86	1,31	1,23	1,40	0,6d	0	1,62	0,45	---	1,99
2. Serie	8	0,40	0,73	1,07	1,21	---	---	0,77	0,66	1,02	0,94
3. Serie	0,18	0,49	0,91	0,83	0,9o	---	---	0,94	0,64	0,60	0,5o
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	18,33	16,43	15,83	15,23	14,3o	---	---	13,83	15,63	13,56	13,51
3. Serie	14,58	14,43	13,54	13,32	13,02	---	---	13,97	12,44	11,59	1o,27

Tabelle Nr. 11 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Histidin im Rattengehirn

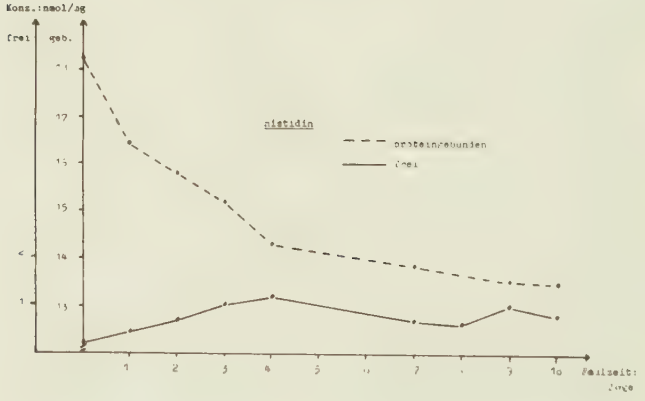


Abb. Nr. 18 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Histidin im Rattengehirn (2. Serie)

Valin	Ausgangswert	Faulzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
		Konzentration nmol/.									
freie Aminosäuren.											
1. Serie ♀	0,50	1,89	2,86	4,51	6,01	4,94	9,58	7,06	13,86	---	---
1. Serie ♂	0,63	2,03	2,76	3,65	---	5,44	5,51	10,61	3,22	---	14,36
2. Serie	8	0,38	1,98	3,01	3,26	---	---	5,94	7,71	8,95	10,96
3. Serie	0,34	1,42	2,55	3,15	3,25	---	---	7,31	7,55	7,47	7,40
proteingeb. Aminosäuren											
2. Serie	40,36	39,38	37,68	37,67	36,33	---	---	32,69	34,33	28,44	30,65
3. Serie	35,57	36,28	35,10	32,07	34,60	---	---	31,32	27,71	24,73	23,54

Tabelle Nr. 12 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Valin im Rattengehirn

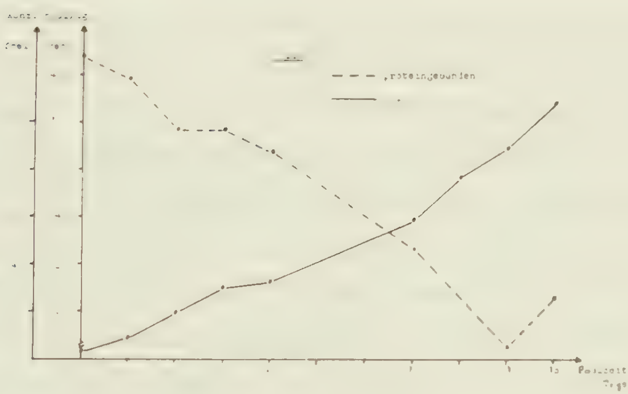


Abb. Nr. 19 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Valin im Rattengehirn (2. Serie)

Gruppe 1 : Glutaminsäure, Glycin, Lysin, Arginin, Alanin, Isoleucin, Tyrosin, Leucin, Phenylalanin, Histidin, Valin

Diese untersuchten Aminosäuren sollen gemeinsam besprochen werden, da die Unterschiede in ihrem Konzentrationsverhalten eher quantitativer Natur sind.

4.2.2.1 Die freien Aminosäuren

Vergleicht man das Verhalten der einzelnen freien Aminosäuren in den verschiedenen Serien, so fällt zunächst auf, daß die Verläufe nur bis zu einer Fäulniszeit von ca 4 Tagen gut reproduzierbar sind. Bis zu diesem Zeitpunkt kommt es bei fast allen hier dargestellten Aminosäuren zu einem Konzentrationsanstieg. Danach aber zeigte sich in den verschiedenen Serien ein sehr variables Verlaufsbild : In der graphisch dargestellten 2. Serie fand bei den meisten Aminosäuren ein weiterer Konzentrationsanstieg bis zum 1o. Tag statt. Es fanden sich aber ebenso in den anderen Serien - wie den Tabellen zu entnehmen ist - Konzentrationsabnahmen, gefolgt von erneuten Anstiegen, oder andere Verläufe.

Im Unterschied zu der anschließend besprochenen Gruppe (Serin, Threonin, Asparaginsäure) nähern sich hier die Werte allerdings nicht der Nachweisgrenze, sondern bewegen sich eher auf einem für die jeweilige Substanz hohen Konzentrationsniveau.

Besonders zu erwähnen sind hier Histidin und Arginin, bei denen auch der anfängliche Konzentrationsanstieg nicht in allen Serien auftrat.

4.2.2.2 Die gebundenen Aminosäuren

Im Gegensatz zu dem relativ variablen Verlaufsbild der freien Aminosäuren erwies sich das Verhalten der proteingebundenen Aminosäuren als gut reproduzierbar. Alle untersuchten Substanzen wurden während der zehntägigen Beobachtungszeit relativ stetig aus der Proteinbindung freigesetzt, was sich an einer konstanten Abnahme des proteingebundenen Anteils zeigt. Die Geschwindigkeit dieses Freisetzungsprozesses variiert zwischen den einzelnen Aminosäuren und war in den ersten Fäulnistagen meist am größten (siehe auch 4.1.2).

Diese stetige Proteolyse scheint unabhängig davon zu sein, ob die dabei freigesetzten Aminosäuren abgebaut werden oder sich zunächst als freie Aminosäuren anhäufen (siehe auch 4.1.2).

Auch die absoluten Werte der proteingebundenen Bestandteile scheinen konstant zu sein. Die in der 3. Serie bei fast allen Aminosäuren gleichmäßig niedrigeren Werte sind wahrscheinlich durch einen systematischen Fehler bedingt. Korrigiert man diesen Fehler, der ca 1o % beträgt, so zeigt sich für die absoluten Werte eine gute Reproduzierbarkeit.

Die Verwendbarkeit des Proteolyseprozesses für eine etwaige Todeszeitbestimmung soll später im allgemeinen Zusammenhang diskutiert werden (siehe 5.1.2).

4.2.3 2. Gruppe : Asparaginsäure, Serin, Threonin

Asparaginsäure

Konzentration: nmol/mg

	ausgangs-wert	Reifzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	2,26	4,51	6,72	6,19	6,18	6,55	o	1,49	o	o	0,49
1. Serie ♂	3,35	4,49	6,46	6,03	o	o,2o	1,62	o	o,9o	o,83	o
2. Serie	2,08	3,o1	4,19	3,37	o,78	---	---	o,24	o	o	o
3. Serie	2,66	4,22	5,86	6,33	6,27	---	---	x	x	x	x
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	77,26	7o,29	65,56	63,89	57,88	---	---	52,45	57,23	51,18	49,21
3. Serie	7o,72	65,36	61,12	57,28	52,97	---	---	53,83	47,o3	45,96	42,35

Tabelle Nr. 13 : Postmortale Konzentrationen der freien und gebundenen Asparaginsäure im Rattengehirn

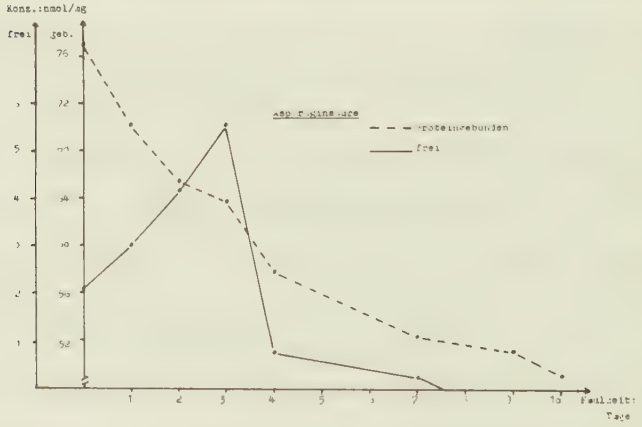


Abb. Nr. 2o : Konzentrationsverhalten der freien und gebundenen Asparaginsäure im Rattengehirn (2. Serie)

Serin

Konzentration (mol/g)

	Ausgangswert	Zeitzeit 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	7,06	9,17	11,75	4,18	5,08	2,87	0,5o	0,31	1,39	o	o,3·
1. Serie ♂	7,46	1o,51	1o,85	8,59	4,82	2,51	o,27	o,66	o,35	o,35	o
2. Serie	5,52	7,87	9,79	12,o2	4,33	—	—	3,7o	2,28	1,2o	1,98
3. Serie	6,11	8,58	11,11	7,62	6,39	—	—	3,64	o,5o	3	3
proteingeb. Aminosäuren											
2. Serie	68,21	63,o3	62,26	55,79	55,36	—	—	48,39	44,44	45,23	39,58
3. Serie	64,18	58,68	55,99	58,42	45,59	—	—	44,11	41,69	41,2o	37,39

Tabelle Nr. 14 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen Serin im Rattengehirn

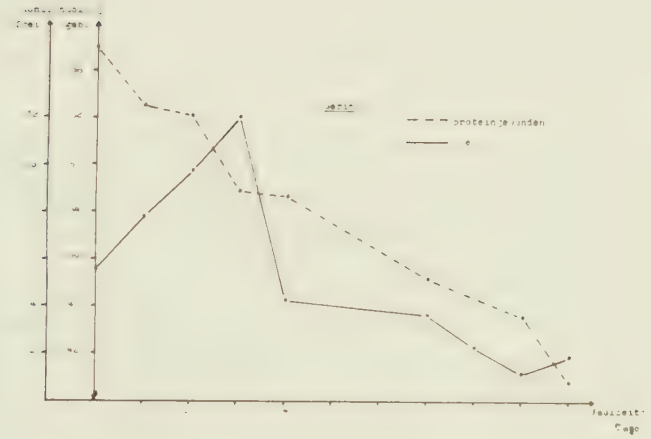


Abb. Nr. 21 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen Serin im Rattengehirn (2. Serie)

Threonin	Ausgangswert	Faulzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
		Konzentration. nmol/mg									
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	1,09	2,32	3,27	4,62	0,84	0,20	0	0	0	S	0
1. Serie ♂	1,15	2,54	3,24	2,78	2,99	0,20	0	0	0	S	0
2. Serie	0,50	1,33	2,28	3,06	3,33	---	---	0,67	0	0	0
3. Serie	0,64	1,73	2,67	2,07	1,34	---	---	1,00	S	S	0
proteingeb. Aminosäuren:											
2. Serie	44,73	37,59	32,38	36,30	32,94	---	---	28,99	35,54	32,12	30,07
3. Serie	40,13	35,50	31,19	25,21	29,84	---	---	31,75	27,99	27,14	26,37

Tabelle Nr. 15 : Postmortale Konzentrationen des freien und gebundenen <u>Threonin</u> im Rattengehirn

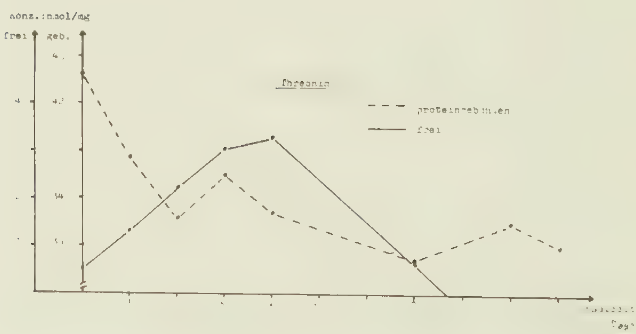


Abb. Nr. 22 : Konzentrationsverhalten des freien und gebundenen <u>Threonin</u> im Rattengehirn (2. Serie)

2. Gruppe : Asparaginsäure, Serin, Threonin

Diese drei Aminosäuren lassen sich wegen des typischen Konzentrationsverhaltens der freien Aminosäuren zu einer Gruppe zusammenfassen.

Im Gegensatz zu den meisten der anderen untersuchten Substanzen zeigte sich hier kein langsamer, sondern ein relativ rascher Konzentrationsanstieg der freien Aminosäuren in den ersten Tagen, der von einem frühen Maximum zwischen dem 2. und 4. Tag gefolgt wird. Danach findet ein schneller Konzentrationsabfall statt und nach dem 7. bis 8. Tag sind die freien Aminosäuren nicht mehr oder nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbar.

Parallel dazu zeigt sich in den ersten Tagen ein relativ schneller Abfall der proteingebundenen Aminosäuren, der sich danach verlangsamt, besonders Threonin wird nach 2 bis 3 Tagen nur noch sehr langsam aus der Proteinbindung freigesetzt.

Dieses Konzentrationsverhalten spricht dafür, daß bei diesen Aminosäuren die Abbaureaktionen nach ihrem Einsetzen schnell ablaufen. Der Abbau überwiegt dann das Freisetzen aus der Eiweißbindung, sodaß sich keine freien Aminosäuren mehr anhäufen. Die proteolytisch freigesetzten Aminosäuren werden durch die Abbauprozesse "weggefangen", für diese Gruppe sind demzufolge Proteolyse- und Abbauraten jeweils gleich (siehe auch 4.1.2).

Aufgrund dieser Beobachtung kann man ein Einsetzen der bakteriellen Abbauprozesse für den 2. bis 4. postmortalen

Tag annehmen und damit diesen Zeitpunkt in Anlehnung an die Ausführungen von BONTE u.a. als eine hypothetische Grenze zwischen Autolyse und Fäulnis (bakterieller Abbau) betrachten.

Eine Erklärung für den schnellen Abbau können unter anderem die vorliegenden pH-Werte liefern. Asparaginsäure, Serin und Threonin werden vor allem über die Desaminierung abgebaut (DALDRUP) und die beobachteten pH- Werte zwischen 6,7 und 7,4 sind gerade für die Desaminasen optimal.

DALDRUP konnte bei Fäulnisuntersuchungen an menschlichen Gehirnen ebenfalls Serin und Threonin in der freien Form nach 24 Stunden, Asparaginsäure nach 44 Stunden nur noch in Spuren nachweisen. Auch dort wurden diese Aminosäuren also offenbar schnell abgebaut.

4.2.4 Ergebnisse der Untersuchungen auf die Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$.

Das Verfahren der enzymatischen Hydrolyse (siehe 3.8) erwies sich nach anfänglichen technischen Schwierigkeiten auch für das Hirngewebe als funktionstüchtig. Abb. Nr. 23 zeigt das Chromatogramm einer Kontrollprobe, bei der vor der Hydrolyse die entsprechenden Isopeptide in definierter Menge zugegeben wurden. Es läßt sich erkennen, daß die Isopeptide durch das Hydrolyseverfahren nicht zerstört wurden und daß sie bei der Hydrolyse gut abgetrennt wurden. Die Peaks dieser Kontrollprobe entsprechen Konzentrationen von jeweils 38 nmol/ml der Isopeptide.

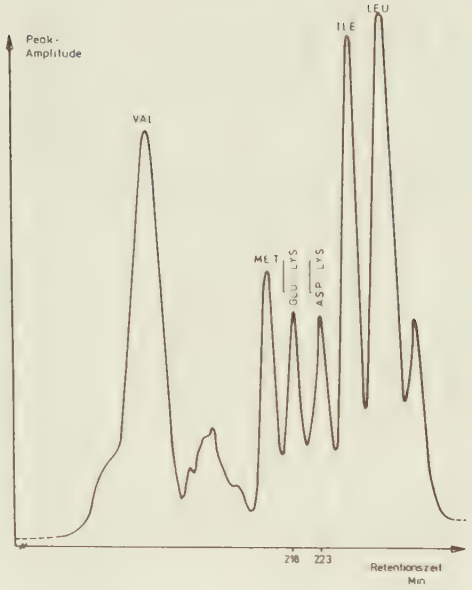


Abb. Nr. 23 : Chromatogramm einer Kontrollprobe nach enzymatischer Hydrolyse (Isopeptide zugegeben)

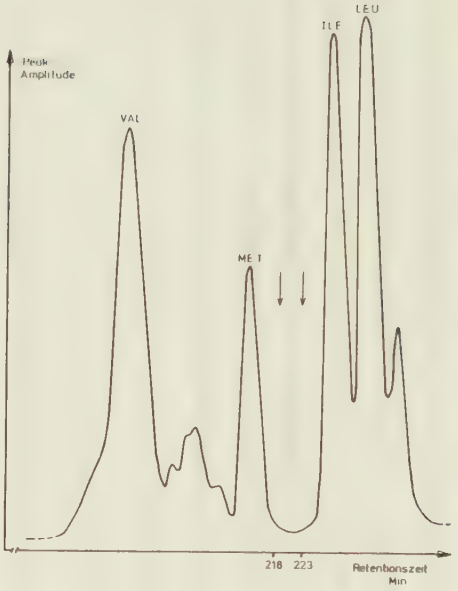


Abb. Nr. 24 : Chromatogramm einer Probe nach enzymatischer Hydrolyse (Rattengehirn)

Die Isopeptide konnten im Rattengehirn weder ca 3o Min. postmortal noch zu einem späterem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Abb. Nr. 24 zeigt ein entsprechendes Chromatogramm.

Betrachtet man ca 1o % der Kontrollpeaks als Nachweisgrenze, so hätten noch ca 3 % der Gesamt-Glutaminsäure, läge sie in einer Isopeptidbindung vor, nachgewiesen werden können.

Die Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$ spielen offenbar in dem untersuchten quantitativen Bereich für die Festigkeit des Rattengehirns keine Rolle.

4.2.5 Die pH-Wert Entwicklung

Tabelle Nr. 16 zeigt die Ergebnisse der pH-Wert Messungen in den verschiedenen Serien über die zehntägige Versuchszeit.

Faulzeit :	Tötung d. Nackenschlag		Tötung d. Äther	
	Serie 1♀	Serie 1♂	Serie 2	Serie 3
1 Std.	6,74	7,29	7,11	7,o5
1 Tg	6,96	7,16	7,2o	7,24
2 Tg	7,41	7,39	7,3o	7,39
3 Tg	7,24	6,87	7,32	7,2o
4 Tg	6,87	6,74	7,12	7,1o
--				
7 Tg	7,1o	7,4o	6,72	6,87
8 Tg	7,42	7,45	6,68	6,79
9 Tg	7,37	7,28	6,75	7,o4
1o Tg	7,31	7,14	6,74	7,1o

Tabelle Nr. 16 : Vergleich der pH-Wert Entwicklung in den verschiedenen Serien

Dabei wurden die beiden verschiedenen Tötungsarten gegenübergestellt. Die Tiere der 1. Serie wurden durch Nackenschlag, die der 2. und 3. Serie durch Äther getötet. Ausgangspunkt für die Versuchsänderung war die Absicht, eventuell durch eine terminale Asphyxie der Tiere eine pH Erniedrigung des Hirngewebes zu erreichen (WANG und SONNENSCHEIN). Durch eine solche pH Erniedrigung sollten pH-Werte erreicht werden, wie sie bei vergleichbaren Versuchen an menschlichen Gehirnen herrschten (DALDRUP). Dieser Effekt wurde - wie die Anfangswerte im Vergleich zeigen - nicht bewirkt.

Als Gemeinsamkeit läßt sich bei allen vier Serien ein anfänglicher pH Anstieg erkennen, der sein Maximum nach einer Fäulniszeit von 2 Tagen erreicht, die Werte liegen dann zwischen 7,3o und 7,41. Danach folgte bei allen Serien ein pH Abfall, wobei als niedrigster Wert 6,68 registriert wurde. Bei diesem pH Abfall zeigte sich eine Diskrepanz zwischen den Fäulnisproben der mechanisch getöteten Tiere und der durch eine Überdosis Äther getöteten Tiere. Während nach mechanischer Tötung das pH-Minimum nach ca 4 Tagen erreicht war, zeigte sich bei den anderen Proben ein langsamerer Abfall. Hier wurde das Minimum erst nach 8 Tagen erreicht.

Abb. Nr. 25 zeigt diese Gegenüberstellung, wobei zur besseren Übersichtlichkeit die Mittelwerte der jeweiligen Serien wiedergegeben sind. Als Folge der geschilderten Entwicklung zeigt sich ein besonders deutlicher pH Unterschied nach 7 - 8 Fäulnistagen.

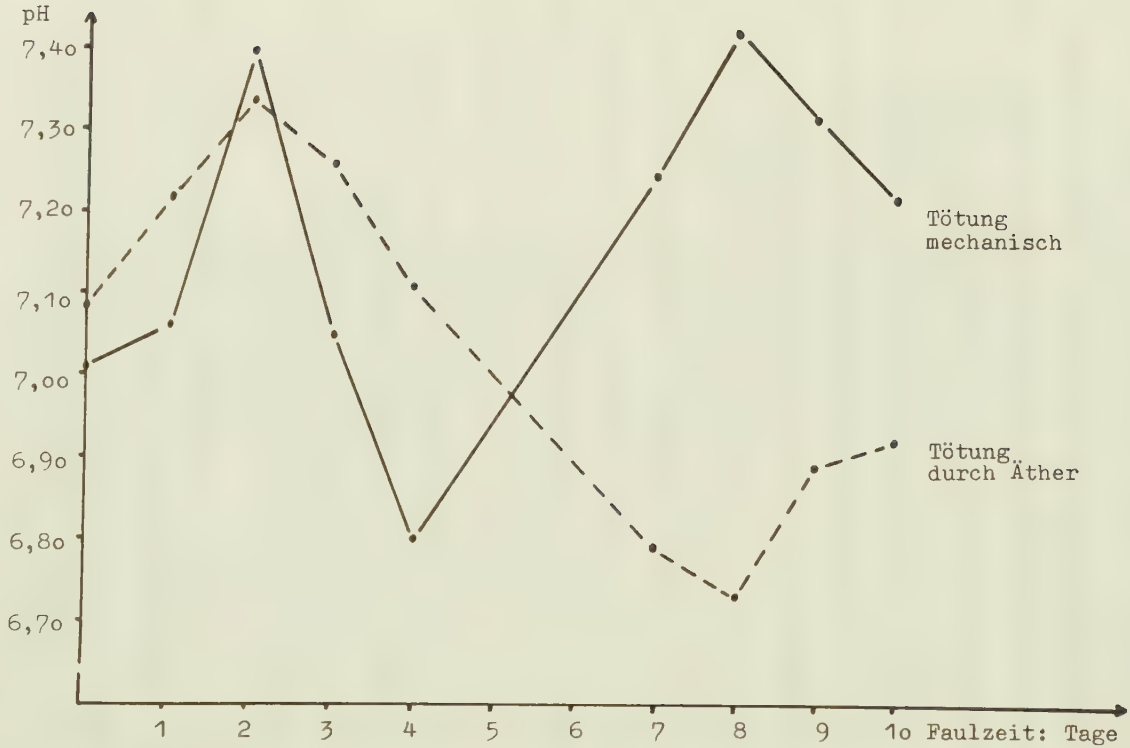


Abb. Nr. 25 : Vergleich der pH Entwicklung bei verschiedenen Tötungsarten

5 Diskussion

Einzelne Erläuterungen wurden bereits bei der Darstellung der Ergebnisse gegeben. An dieser Stelle sollen die Resultate nochmals kurz im Zusammenhang diskutiert werden.

5.1 Reproduzierbarkeit und Verwendbarkeit für eine Todeszeitbestimmung.

Die Verwendbarkeit der Verfahren für eine Todeszeitbestimmung setzt eine hinreichende Reproduzierbarkeit dieser Vorgänge voraus. Hier zeigten sich erhebliche Unterschiede in den Konzentrationsverläufen der freien Aminosäuren einerseits und der gebundenen Aminosäuren andererseits.

5.1.1 Die freien Aminosäuren

Im Konzentrationsverhalten der freien Aminosäuren zeigte sich in den einzelnen Versuchsserien ein relativ variables Verlaufsbild (siehe 4.2.2).

Die meisten freien Aminosäuren wiesen bis zum 4. Fäulnistag einen Konzentrationsanstieg auf. Zu diesem Zeitpunkt setzen wahrscheinlich die bakteriellen Abbauprozesse (Fäulnis) ein (siehe auch 4.2.3). Dieser Abbau erfolgt bei den einzelnen freien Aminosäuren verschieden schnell. So werden z.B. Valin und Alanin unter den vorliegenden Bedingungen kaum abgebaut (siehe auch 4.1.2), sodaß sich freies Valin und Alanin anhäufen. Serin z.B. wird gut abgebaut, sodaß freies Serin nach ca 8 Tagen kaum noch nachweisbar war

(siehe 4.2.3). Bei den meisten Aminosäuren stellte sich ein gewisses Gleichgewicht zwischen Proteolyse und Abbau ein.

Vergleicht man dieses Abbaugeschehen für bestimmte Aminosäuren in den verschiedenen Serien, so zeigten sich hinsichtlich der absoluten Konzentrationswerte erhebliche Unterschiede. Auch im Vergleich mit Messungen der freien Aminosäuren im faulenden menschlichen Gehirn finden sich neben Übereinstimmungen relativ große Abweichungen (siehe 5.2).

Aus diesen Beobachtungen kann man folgende Schlüsse ziehen : Das Abbaugeschehen der proteolytisch freigesetzten Aminosäuren reagiert offenbar auf Änderungen der Einflußparameter (pH-Wert, mikrobielle Flora etc.) sehr empfindlich, sodaß eine Todeszeitbestimmung aus der Analyse der freien Aminosäuren sehr erschwert wird.
Lediglich der Konzentrationsverlauf des freien Serin und Threonin und der freien Asparaginsäure bietet hier einen relativ sicheren Hinweis auf die Fäulniszeit. Diese drei Aminosäuren waren nach 8 Tagen Fäulnis nur noch selten in freier Form nachweisbar, sodaß ein positiver Ausfall dieser Bestimmung für eine entsprechend kurze Fäulniszeit spricht. Diese Beobachtung deckt sich auch mit Ergebnissen an menschlichen Gehirnen (siehe 4.2.3).

5.1.2 Die proteingebundenen Aminosäuren

Die Abnahme der proteingebundenen Aminosäuren zeigte einen stetigen Verlauf und erwies sich als gut reproduzierbar.

Abb. Nr. 26 zeigt als Beispiel nochmals die Abnahme der proteingebundenen Glutaminsäure.

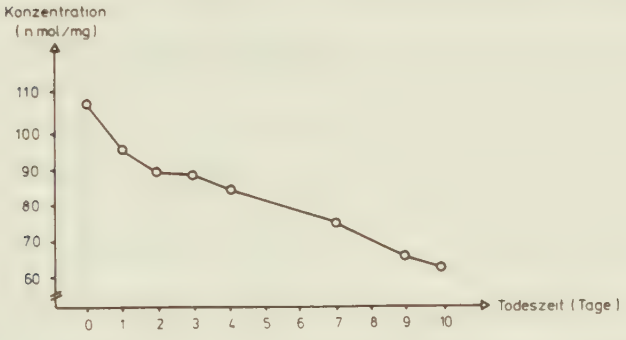


Abb. Nr. 26 : Konzentrationsverhalten der proteingebundenen Glutaminsäure im Rattengehirn

Die gute Reproduzierbarkeit dieser Vorgänge auch im Hinblick auf die absoluten Werte (siehe 4.2.2) spricht dafür, daß das Proteolysegeschehen weniger von Umwelteinflüssen variiert wird als das Abbaugeschehen. Es bietet sich nach diesen Untersuchungen für eine Todeszeitbestimmung an und sollte weiter auf seine Beeinflußbarkeit hin untersucht werden.

Ein begrenzender Faktor für eine solche Bestimmung ist das natürliche "Aufbrauchen" der Proteine : Nach zehntägiger Fäulnis waren z.B. 43 % der Glutaminsäure bereits proteolytisch freigesetzt (siehe auch 4.1.2).

5.2 Vergleich mit Untersuchungsergebnissen an menschlichen Gehirnen.

Vergleicht man die dargelegten Analysenergebnisse der freien Aminosäuren mit den von T.DALDRUP erhobenen Werten bei Fäulnisuntersuchungen an menschlichen Gehirnen, so läßt sich folgendes feststellen : Neben guten Übereinstimmungen wie z.B. für das Konzentrationsverhalten des freien Alanin, Lysin oder Arginin finden sich auch erhebliche Abweichungen. Dafür einige Beispiele : Glycin wurde von DALDRUP ab 44 St. nur noch in Spuren festgestellt, während wir über die gesamte zehntägige Versuchszeit einen stetigen Anstieg dieser Aminosäure registrierten. Die Delta-Aminovaleriansäure, ein Abbauprodukt des Prolins bzw. Ornithins, wurde von uns nur vereinzelt in Spuren aufgefunden, während DALDRUP es im menschlichen Gehirn bei pH-Werten unter 7 regelmäßig und in steigenden Konzentrationen nachweisen konnte. Andererseits tauchen Leucin und Valin in der vorliegenden Untersuchung in erheblich höheren Konzentrationen auf.

Diese Abweichungen lassen sich nur teilweise durch die anderen pH-Bedingungen erklären und zeigen, daß die tierexperimentellen Ergebnisse nur eingeschränkt auf menschliche Verhältnisse übertragbar sind. So spielt möglicherweise eine andere mikrobielle Besiedelung eine Rolle und es ist denkbar, daß die dünne Schädeldecke der Ratte eine Sauerstoffdiffusion zuläßt und auch auf diese Weise für die Ausprägung einer anderen Bakterienflora und damit anderer Enzymsysteme sorgte.

5.3 Wertung der Ergebnisse im Hinblick auf die von DALDRUP entwickelte Todeszeitformel.

Die von DALDRUP anhand von menschlichem Obduktionsmaterial entwickelte Todeszeitformel basiert auf dem Quotienten

$$\frac{[\text{Gamma-Aminobuttersäure}] + [\text{Alpha-Aminobuttersäure}]}{[\text{Glutaminsäure}]}$$

(siehe auch 2.6.4). Sie konnte durch die vorliegenden Untersuchungen nicht überprüft werden. Wie oben bereits angeführt, zeigte sich anhand mehrerer Vergleiche, daß diese tierexperimentellen Ergebnisse nur teilweise mit den an menschlichem Material gewonnenen Werten übereinstimmen.

Im Falle des Glutaminsäureabbaus zu Gamma- und Alpha-Aminobuttersäure spielt unter anderem sicherlich der pH-Bereich eine Rolle. DALDRUP wies bei seinen Untersuchungen darauf hin, daß Voraussetzung für die Verwendbarkeit dieser Todeszeitformel ein pH-Bereich zwischen 4,5 und 6,8 sei, der eine ausreichende Decarboxylasenaktivität gewährleistet. Wie oben dargelegt (4.2.5), wurden hier pH-Werte unter 6,8 nur selten erreicht. Folgerichtig fand DALDRUP bei seinen Untersuchungen unter ausreichender Decarboxylasenaktivität bereits nach zwei Tagen einen Konzentrationsabfall der freien Glutaminsäure verbunden mit einem entsprechenden Anstieg der Gamma- und Alpha-Aminobuttersäure. Dagegen fand sich in den vorliegenden Untersuchungen während der gesamten Versuchsdauer ein stetiger Anstieg der Glutaminsäurekonzentration (siehe S. 33). Die physiologisch vorhandene Gamma-Aminobuttersäure dagegen fiel ab (siehe Abb. folgende Seite).

	Gamma-Aminobuttersäure										
	Ausgangs-wert	Maulzeit: 1 Tag	2 Tage	3 Tage	4 Tage	5 Tage	6 Tage	7 Tage	8 Tage	9 Tage	10 Tage
	Konzentration: nmol/mg										
freie Aminosäuren:											
1. Serie ♀	7,40	6,63	7,33	6,47	5,47	5,21	3,06	4,56	10,93	3,09	3,06
1. Serie ♂	6,68	6,78	6,49	4,94	5,06	5,06	3,34	4,57	3,10	2,40	1,40
2. Serie	4,81	6,38	6,12	5,47	4,61	---	---	3,02	2,40	1,82	1,57
3. Serie	6,98	5,38	5,36	4,24	3,71	---	---	1,75	1,52	1,35	1,19

Tabelle Nr. 17 :Postmortale Konzentrationen der Gamma-Aminobuttersäure im Rattengehirn

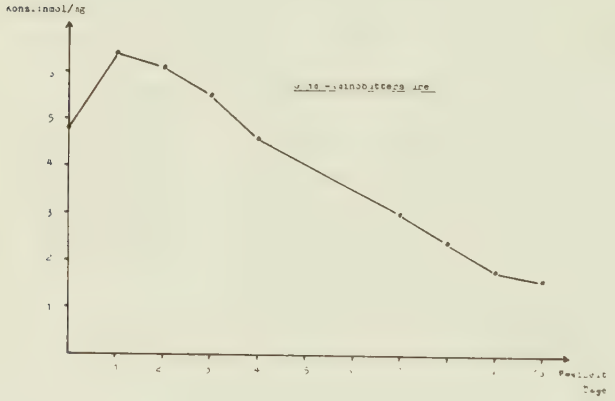


Abb. Nr. 27 : Konzentrationsverhalten der Gamma-Aminobuttersäure im Rattengehirn (2. Serie)

Die Alpha-Aminobuttersäure, das zweite Abbauprodukt der Glutaminsäure, wurde nicht in nachweisbaren Mengen gebildet. Die Aktivität der entsprechenden Decarboxylase war also offenbar zu gering bzw. nicht vorhanden, um einen Abbau der Glutaminsäure zu bewirken.

Die an menschlichem Obduktionsmaterial entwickelte Formel

läßt sich demzufolge nicht durch diese Tierexperimente überprüfen.

5.4 Wertung der Ergebnisse der pH-Bestimmungen

Bei den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich nach 7 - 8 Tagen eine pH-Werte-Diskrepanz für die beiden Tötungsarten (mechanisch - Äther). Eine mögliche Korrelation zwischen Todesursache und pH-Wert des Hirngewebes wurde u.a. von DIESSNER und LAHL untersucht. Sie konnten eine signifikante Beziehung anhand von menschlichem Obduktionsmaterial nicht feststellen.

Die hier ermittelten Ergebnisse sind zahlenmäßig zu gering, um eine solche Korrelation für einen späteren postmortalen Zeitpunkt (ca 8 Tage) zu belegen, sie können aber immerhin als Hinweis gewertet werden (siehe 4.2.5).

6 Zusammenfassung

Der Arbeit liegen tierexperimentelle Untersuchungen an Rattengehirnen zugrunde. Über eine Versuchsdauer von zehn Tagen wurden die getöteten Tiere auf natürliche Weise der Fäulnis überlassen und in 24-stündlichem Abstand die Veränderungen im Hinblick auf das postmortale Konzentrationsverhalten der freien und gebundenen Aminosäuren im Hirngewebe untersucht. Außerdem wurde überprüft, ob die zwischen Proteinketten brückenbildenen Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$ für die Festigkeit des Gehirns eine Rolle spielen. Insgesamt wurden 4o Versuchstiere untersucht.

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen :

1. Es zeigte sich, daß erst die parallele Bestimmung von freien und proteingebundenen Aminosäuren differenziertere Aussagen über Proteolyse und Abbau der Aminosäuren erlaubt.

2. Freie Aminosäuren

a) Die untersuchten freien Aminosäuren zeigten bis zu einer Fäulniszeit von ca 4 Tagen einen Konzentrationsanstieg, danach stellte sich ein variables Verlaufsbild ein, welches das differierende bakterielle Abbaugeschehen der einzelnen Aminosäuren charakterisiert.

b) Am schnellsten wurde dabei Serin abgebaut (Verminderung des Ausgangswerts um 43 %), am langsamsten wurden Valin und Alanin abgebaut (keine Verminderung des Ausgangswerts).

c) Serin, Threonin und Asparaginsäure waren nach ca 8 Tagen Fäulnis nur noch selten in freier Form nachweisbar, sodaß ein positiver Ausfall dieser Bestimmung für eine entsprechend kurze Fäulniszeit spricht.

d) Aufgrund der Beobachtung des Aminosäureabbaus kann man ein Einsetzen der bakteriellen Abbauprozesse (Fäulnis) für den 2. bis 4. Tag annehmen.

e) Bei einem Vergleich zeigte sich, daß eine Übertragung der Ergebnisse auf menschliche Verhältnisse nur eingeschränkt möglich ist.

f) Insgesamt reagiert das Abbaugeschehen der proteolytisch freigesetzten Aminosäuren offenbar auf Änderungen der Einflußparameter (pH-Wert, mikrobielle Flora etc) sehr empfindlich, sodaß die Analyse freier Aminosäuren für eine Todeszeitbestimmung wenig geeignet erscheint.

3. Proteingebundene Aminosäuren

a) Die proteingebundenen Aminosäuren wurden über die gesamte zehntägige Versuchsdauer stetig aus der Proteinbindung freigesetzt und zeigten einen entsprechenden Konzentrationsabfall zwischen 43 % (Glutaminsäure) und 25 % (Valin). Auch die absoluten Werte waren in den verschiedenen Serien gut reproduzierbar.

b) Diese stetige Proteolyse scheint unabhängig davon zu sein, ob die dabei freigesetzten Aminosäuren abgebaut werden

oder sich zunächst als freie Aminosäuren anhäufen.

c) Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse bietet sich das Ptoteolysegeschehen für eine Todeszeitbestimmung an und sollte auf seine Beeinflußbarkeit hin weiter geprüft werden.

4. Die Isopeptide $\overline{\text{Asp Lys}}$ und $\overline{\text{Glu Lys}}$ konnten im Hirngewebe der Ratte nicht nachgewiesen werden.

7 Literatur

1 Abernethy, J.L., Hill, R.L., Goldsmith, L.A.

ε-(γ- Glutamyl) Lysine Cross Links in Human Stratum Corneum

J. Biol. Chem.
252 (1977) 1837 - 1839

2 Berg, S.

Das postmortale Verhalten des Blutes

Dtsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.
4o (195o) 1 - 75

3 Bleifuss, K.J.

Experimentelle Untersuchungen zum Auftreten von Ptomainen in Fäulnissubstraten

Med. Diss., Göttingen 1977

4 Bonte, W., Rustemeyer, J.

Quantitative Untersuchungen zur Entwicklung des Aminosäure - Spektrums in faulender Leber

Z. Rechtsmed.
76 (1975) 293 - 3o6

5 Daldrup, T.

Postmortaler Eiweißzerfall in menschlichen Organen

Triltsch Verlag, Düsseldorf 1979

6 Diessner, H., Lahl, R.

Die postmortale Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration im Hirngewebshomogenat und ihre Relation zu Todesursache, Todesablauf und Todeszeit an einem unausgewählten Obduktionsmaterial

Zentralbl. Allg. Pathol.
112 (1969) 162 - 17o

7 Folk, J.E., Finlayson, J.S.

The ε-(γ-Glutamyl) Lysine Crosslink and the catalytic role of Transglutaminases

Adv. Protein Chem., Vol 31
Acad. Press New York - San Franzisko - London 1977

8 Habeck, D., Kehrer, H.E., Schmidt, H.

Das postmortale Eiweißbild des liquor cerebrospinalis

Arch. Psychiatr. Nervenkr.
200 (1960) 439 - 454

9 Hagenmeyer, H.E., Schmitz, I., Föhles, J.

Zum Vorkommen von Isopeptidbindungen in der Eihülle der Regenbogenforelle

Zeitschr. Physiol. Chem.
357 (1970) 1435 - 1438

10 Harsanyi, L., Santora, Z.

Untersuchungen der Eiweißkomponenten des Knochengewebes

Vortrag 53. Jahrestagung Dtsch. Ges. Rechtsmed. Göttingen 1974

11 Heifer, H., Bolkenius, M.

Gc Diagnostik und Proteolyse in gelagerten Bluten, Leichenbluten und Blutspuren

Dtsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.
58 (1966) 76 - 90

12 Kleinsorge, V.

Autolysebedingte Konzentrationsänderungen der freien Aminosäuren im Glaskörper des Auges

Med. Diss., Göttingen 1978

13 Konikova, A.S., Pogasova, A.V., Nikulin, V.I.

Restoration of protein synthesis after death and the effect of postmortal cooling

Nature New Biol.
235 (1972) 83 - 85

14 Lerke, P., Farber, L., Adams, R.

Bacteriology of spoilage of fish muscle
4. Role of protein

Appl. Environ. Microbiol.
15 (1967) 77o - 776

15 Müller, H.E.

Methodische Untersuchungen in vitro zur Einwirkung bakterieller Proteasen auf menschliche Plasmaeiweißkörper, dargestellt am Beispiel von Pseudomonas aeruginosa

Zentralbl. Bakteriol. (A)
216 (1971) 79 - 87

16 Schmidt, O., Forster, B., Schulz, G.

Untersuchungen über die Anteile der Eigen- und Fremdfermente am postmortalen Eiweißzerfall

Dtsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.
52 (1961) 28 - 45

17 Schmitz, I.

Analyse von säurelabilen Aminosäurederivaten nach enzymatischer Totalhydrolyse von Proteinen und Keratinen

Nat. Diss. , Aachen 1975

18 Schmitz, I., Zahn, H., Klostermeyer, H., Rabbel, K., Watanabe, K.

Zum Vorkommen von Isopeptidbindungen in erhitztem Milcheiweiß

Z. Lebensm. Unters. Forsch.
160 (1976) 377 - 381

19 Shikata, I., Maeiwa, M., Otani, T.

Postmortem changes in muscles; Changes in the concentrations of free amino acids in muscle

Tokushima J. Exp. Med.
17 (1970) 21 - 31

20 Sprung, R.

Mikrobielle Einflüsse auf die postmortalen Konzentrationsveränderungen der Aminosäuren in Rinderblut

Med. Diss., Göttingen 1978

21 Starka, J.

Physiologie und Biochemie der Mikroorganismen

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1968

22 Strassmann, G.

Über Leichenveränderungen, autolytische, Fäulnis- und Verwesungsvorgänge

Dtsch. Zeitschr. ges. gerichtl. Med.

3 (1924) 359 - 371

23 Theusner, J.

Über die Identifizierung einer fäulnistypischen Substanz und ihre Bedeutung für die forensische Leichenzeitbestimmung

Med. Diss., Göttingen 1978

24 De Vuyst, A., Verwack, K., Vanbelle, M., Foulon, M.

Composition en acides amines de muscles et d'organes de boeuf

Revue de Fermentations et des Industries Alimentaires
30 (1975) 37 - 42

25 Wang, R.I.H., Sonnenschein, R.R.

pH of cerebral cortex during induced convulsions

J. Neurophysiol.
18 (1955) 130 - 137

26 Watanabe, H.

On the putrefaction process investigated by the socalled paper chromatography of aminoacids, amines and their similar compounds

Jap. J. Leg. Med.
9 (1955) 561 - 574

27 Wuhrmann, F.

Reststickstoff und Xanthoproteinreaktion im Agonal- und Leichenblut

Z. Klin. Med.
127 (1934) 499 - 513

Für die Überlassung des Themas und die wertvolle Kritik danke ich Herrn Prof. Dr. H. Schweitzer. Herrn Dr. T. Daldrup danke ich für die vielfältigen Anregungen und die freundliche Betreuung.

Lebenslauf

Am 12.2.1957 wurde ich, Wilhelm Theres, als zweiter Sohn des Steinmetzmeisters Valentin Theres und seiner Ehefrau Katharina, geb. Jakobi, in Bitburg geboren.
1964 wurde ich in die Volksschule Burbach eingeschult, seit 1967 besuchte ich das Staatl. Regino Gymnasium in Prüm, wo ich 1975 die Reifeprüfung ablegte. Im gleichen Jahr nahm ich das Studium der Medizin an der Johannes Gutenberg Universität in Mainz auf. 1978 wechselte ich an die Universität Düsseldorf.
Zur Zeit befinde ich mich im 13. Semester und beabsichtige, im Frühjahr 1982 mein Staatsexamen abzulegen.